

Date: July 1, 2003

Express Mail Label: EV 214949144 05

Inventors: Ryoichi Hashida, Shinji Kagaya, Yuji Sugita and Hirohisa Saito  
Attorney's Docket No.: 3462.1004-000

## アレルギー性疾患の検査方法、および治療のための薬剤

### FIELD OF THE INVENTION

- 本発明は、アレルギー性疾患に関連するTR 3またはTINUR遺伝子の発現を指標としたアレルギー性疾患の検査方法、およびアレルギー性疾患治療薬候補化合物のスクリーニング方法、並びにアレルギー性疾患の治療のための薬剤に関する。

### BACKGROUND OF THE INVENTION

- アトピー性皮膚炎等のアレルギー性疾患は、多因子性の病気(multifactorial diseases)と考えられている。これらの病気は多くの異なる遺伝子の発現の相互作用によって起こり、これらの個々の遺伝子の発現は、複数の環境要因によって影響を受ける。このため、特定の病気を起こす特定の遺伝子を解明することは、非常に困難である。

- またアレルギー性疾患には、変異や欠陥を有する遺伝子の発現や、特定の遺伝子の過剰発現や発現量の減少が関わっていると考えられている。病気に関して遺伝子発現が果たしている役割を解明するためには、遺伝子が発症にどのように関わり、薬剤などの外的な刺激が遺伝子発現をどのように変化させるのかを理解する必要がある。

- 近年の遺伝子発現の解析技術の発達により、多くの臨床試料で、遺伝子の発現を解析・比較することが可能となった。このような方法としては、ディファレンシャルディスプレイ(DD)法が有用である。ディファレンシャルディスプレイ法は、ライアンおよびパディー(Liang and Pardee)によって1992年に最初に開発された(Science, 1992, 257:967-971)。この方法を用いることによって、1回に数十種類以上のサンプルをスクリーニングすることができ、それらのサンプル中で発現が変化した遺伝子を検出することが可能である。このような方法を用いて、変異が生じた遺伝子や、時間や環境とともに発現が変わるような遺伝子を調べることによって、病因遺伝子の解明のために重要な情報がもたらされることが期待される。これらの遺伝子には、環境要因によって発現に影響を受けるような遺伝子も含まれる。

- さて、現在アレルギー性疾患の診断においては、一般に、問診、家族歴、そして本人の既往症の確認が重要な要素となっている。またアレルギーをより客観的な情報に基づいて診断するために、血液を試料とする試験方法や、アレルゲンに対する患者の免疫学的な応答を観察する方法も実施されている。前者の例として、アレルゲン特異的IgE測定、白血球ヒスタミン遊離試験、あるいはリンパ球幼若化試験等が挙げられる。アレルゲン特異的IgEの存在は、そのアレルゲンに対するアレルギー反応の証明である。しかし患者によっては、必ずしもアレルゲン特異的なIgEを検出できるとは限らない場合もある。また、その測定原理上、診断に必要なアレルゲンの全てに対して、試験を実施しなければならない。白血球ヒスタミン遊離試験やリンパ球幼

若化試験は、免疫システムのアレルゲンに対する反応を *in vitro* で観察する方法である。これらの方法は、操作が煩雑である。

一方、患者を実際にアレルゲンに接触させたときに観察される免疫応答をアレルギーの診断に役立てる方法（後者）も公知である。プリック・テスト、スクラッチ・テスト、パッチ・テスト、皮内反応、あるいは誘発試験等が、この種の試験に含まれる。これらの試験では、患者のアレルギー反応を直接診断することができる反面、実際に被検者をアレルゲンに曝露する侵襲性の高い検査であると言えることができる。

この他、アレルゲンにかかわらず、アレルギー反応の関与を証明するための試験方法も試みられている。例えば、血清 IgE 値が高値である場合、その患者にはアレルギー反応が起きていると推定することができる。血清 IgE 値は、アレルゲン特異 IgE の総量に相当する情報である。アレルゲンの種類にかかわらず IgE の総量を決定することは容易であるが、非アトピー型気管支炎等の疾患を持つ患者では、IgE が低値となる場合がある。

好酸球数と ECP 値は、I 型アレルギーに引き続いて起きる遅延型反応や、アレルギー性炎症反応に関連する診断項目である。好酸球の数は、アレルギー症状の進展を反映するとされている。また、好酸球の顆粒に含まれるタンパク質である ECP (eosinophil cationic protein) も、喘息患者の発作に伴って強く活性化される。これらの診断項目は、確かにアレルギー症状を反映するものではある。しかし、実際に診断の指標とできる範囲は限られている。

従って、アレルゲンにかかわらず、アレルギー患者の病態の把握や治療方針の決定に役立てることができる診断指標が求められていた。患者に対する危険が少なく、しかも診断に必要な情報を容易に得ることができるアレルギー性疾患のマーカーは非常に有用である。アレルギー性疾患に関連する遺伝子を同定することができれば、該遺伝子の発現を指標とすることにより、アレルギー性疾患の検査が可能となる。さらに、該タンパク質の細胞における機能が解明すれば、その機能に関する知見を基に、アレルギー性疾患の治療方法、および治療のための薬剤の開発が進むものと期待される。

#### SUMMARY OF THE INVENTION

本発明は、このような状況に鑑みてなされたものであり、その目的は、アレルギー性疾患に関連する遺伝子を同定することにある。さらに、本発明は、該遺伝子の発現を指標としたアレルギー性疾患の検査方法、およびアレルギー性疾患治療薬候補化合物のスクリーニング方法、並びにアレルギー性疾患の治療のための薬剤を提供することを目的とする。

本発明者らは上記課題を解決するために、鋭意研究を行った。一般に好酸球は、アトピー性皮膚炎の代表的な臨床指標とされていることから、本発明者らは、好酸球に

において発現レベルが変化する遺伝子を単離することができれば、アトピー性皮膚炎に直接的に関与する遺伝子の単離が可能となるものと考えた。

まず、本発明者らは、アレルギー性疾患特異的に発現量が異なる遺伝子の同定を試みた。アトピー性皮膚炎患者の種々の病態（軽症、重症ステロイド感受性、重症ステロイド抵抗性）と健常人の末梢血好酸球で発現している遺伝子について、ジーンチップを用いてディファレンシャルな発現比較解析を行った。3 倍以上の発現変動のあった遺伝子を選別し、既知遺伝子が主として載っている A チップ遺伝子約 12,000 個の中から、TR3 遺伝子を選択した。健常を含めて各群 2 例の好酸球 RNA をジーンチップにかけ、各症例間 2 x 2 で 4 通りの発現比較を行った。TR3 は、健常と重症（ステロイド感受性）間の 4 つすべての組合せにおける発現比較において、いずれも 3 倍以上変動（重症で亢進）していることが分かった。そこで、より n 数の多いアトピー性皮膚炎患者と健常人の末梢血好酸球パネルで、RT-PCR による遺伝子の発現定量を行ったところ、健常人 < 患者というジーンチップで得られた結果が再現した。

TR3 は核内オーファン受容体サブファミリーの  $\alpha$  タイプとして知られているが、これまでのところ、アレルギー性疾患との関連については報告されていない。

さらに本発明者らは、TR3 との機能的な類似性が予測される核内オーファン受容体サブファミリーの  $\beta$  タイプである TINUR について、TR3 と同様に例数が一群 10 例以上まとまった同じ患者末梢血好酸球パネルを用いて、ABI7700 により健常人と患者との発現比較を行った。その結果 TINUR 遺伝子の発現は、健常に比してアトピー性皮膚炎患者で症例の強弱にはあまりかわりなく有意に亢進することが確認された。TR3 同様、これまでのところ、TINUR 遺伝子とアレルギー性疾患との関連については報告されていない。

アトピー性皮膚炎患者の末梢血好酸球で、アポトーティックな性格が示唆されるような遺伝子の亢進が見られるのは、病態に伴って末梢血で増加する好酸球を減少させなければならないというネガティブフィードバック制御が働くためと考えられる。従って、TR3 または TINUR 遺伝子の発現誘導は治療効果と相関する可能性が高いものと考えられる。

本発明の TR3 または TINUR 遺伝子の発現量を指標とすることにより、アレルギー性疾患を検査することが可能である。

また、TR3 および TINUR 受容体はオーファン受容体であり生体内リガンドや活性化物質はこれまでのところ見つかっていなかった。本発明者らは、リガンドの探索のためのハイスループット系を開発し、この系を使用することにより TR3 または TINUR の転写活性化作用を有すると考えられる化合物の取得に成功した。該化合物はシクロペンテノン構造を持つプロスタグランジン（PGA 誘導体）であり、TR3 または TINUR 受容体の生体内リガンドである可能性が考えられた。また、該受容体のリガンド結合ドメイン (LBD) 領域を欠失させた変異体を用いた実験から、プロスタグランジン誘導

体が実際に該受容体の LBD 領域に作用して働くことが示唆された。さらに、ビアコアを利用した実験から、PGA 誘導体が TR3 および TINUR へ結合することが証明された。

即ち本発明者らは、アレルギー性疾患治療薬候補化合物のスクリーニングを行うことが可能であること、および、PGA 誘導体が TR3 もしくは TINUR のリガンド活性物質であることを見出した。

さらに本発明者らは、ファーマコフォアモデルにより、PGA 誘導体の TR3 リガンド結合領域に対する結合位置をシミュレートし、PGA 誘導体のレポーター系における構造活性相関情報から、結合ポケットに適合する PGA 誘導体以外の化合物をデータベースより選択した。これらの化合物は、TR3 受容体のリガンドとして機能することが期待される。

TR3 または TINUR 遺伝子の発現を誘導する化合物、あるいは TR3 または TINUR 受容体と結合し、転写活性を促進する化合物（例えば、リガンド活性物質）は、アレルギー性疾患に対する治療効果が期待される。

また本発明者らは、好酸球 CD30 に対するアゴニスト活性をもった抗 CD30 抗体で細胞のアポトーシス刺激を行ったところ、培養末梢血好酸球中で TR3 および TINUR の発現が劇的に誘導されることを初めて見出した。このことから、好酸球 CD30 リガンド刺激によって、TR3 もしくは TINUR 遺伝子の発現を上昇させ、好酸球における TR3 または TINUR の下流遺伝子の発現を制御することによって好酸球のアポトーシスを誘導することを機序とするアレルギー性疾患治療薬が提供される。

本発明は、アレルギー性疾患時、活性化した好酸球において高い発現を示す TR3 または TINUR 遺伝子の発現を指標としたアレルギー性疾患の検査方法、およびアレルギー性疾患治療薬候補化合物のスクリーニング方法、並びにアレルギー性疾患の治療のための薬剤に関し、より具体的には、

〔１〕 次の工程を含む、アレルギー性疾患の検査方法、

（a）被検者の好酸球細胞における、TR3 または TINUR 受容体タンパク質、または前記タンパク質をコードする遺伝子の発現レベルを測定する工程

（b）健常者の好酸球細胞における前記タンパク質または遺伝子の発現レベルと比較する工程

〔２〕 遺伝子の発現レベルを、cDNA の PCR によって測定する、〔１〕に記載の検査方法、

〔３〕 アレルギー性疾患がアトピー性皮膚炎である、〔１〕または〔２〕に記載の検査方法、

〔４〕 TR3 または TINUR 受容体タンパク質をコードするポリヌクレオチド、またはその相補鎖に相補的な塩基配列を有する少なくとも 15 塩基の長さを有するオリゴヌクレオチドからなる、アレルギー性疾患検査用試薬、

〔５〕 次の工程（１）および（２）を含む、候補化合物が下記（ａ）または（ｂ）に記載のポリヌクレオチドの発現レベルに与える影響を検出する方法、  
（１）下記（ａ）または（ｂ）に記載のポリヌクレオチドを発現する細胞に候補化合物を接触させる工程

- 5       （ａ）ＴＲ３またはＴＩＮＵＲ受容体タンパク質をコードするポリヌクレオチド  
          （ｂ）ＴＲ３またはＴＩＮＵＲ受容体タンパク質をコードするポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドであって、アトピー性皮膚炎患者の好酸球において発現が増加するタンパク質をコードするポリヌクレオチド

- 10      （２）前記（ａ）または（ｂ）に記載のポリヌクレオチドの発現レベルを測定する工程

          〔６〕 細胞が株化白血球細胞である〔５〕に記載の方法、

          〔７〕 次の工程（１）および（２）を含む、候補化合物が下記（ａ）または（ｂ）に記載のポリヌクレオチドの発現レベルに与える影響を検出する方法、

- 15      （ａ）ＴＲ３またはＴＩＮＵＲ受容体タンパク質をコードするポリヌクレオチド  
          （ｂ）ＴＲ３またはＴＩＮＵＲ受容体タンパク質をコードするポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドであって、アトピー性皮膚炎患者の好酸球において発現が増加するタンパク質をコードするポリヌクレオチド

- 20      （１）被検動物に候補化合物を投与する工程、および

          （２）被検動物の好酸球細胞における前記（ａ）または（ｂ）に記載のポリヌクレオチドの発現強度を測定する工程

- 〔８〕 〔５〕～〔７〕のいずれかに記載の方法によって、前記発現レベルに与える影響を検出し、対照と比較して前記発現レベルを上昇させる化合物を選択する工程  
25      を含む、前記（ａ）または（ｂ）に記載のポリヌクレオチドの発現レベルを上昇させる化合物のスクリーニング方法、

          〔９〕 次の工程（１）および（２）を含む、候補化合物がＴＲ３またはＴＩＮＵＲ受容体タンパク質をコードするポリヌクレオチドの発現レベルに与える影響を検出する方法、

- 30      （１）ＴＲ３またはＴＩＮＵＲ受容体タンパク質をコードする遺伝子の転写調節領域と、レポーター遺伝子とが機能的に結合した構造を有するＤＮＡを含む細胞または細胞抽出液と、候補化合物を接触させる工程、および

          （２）前記レポーター遺伝子の活性を測定する工程

- 〔１０〕 〔９〕に記載の方法によって、候補化合物の前記活性に与える影響を検  
35      出し、対照と比較して前記活性を上昇させる化合物を選択する工程を含む、ＴＲ３ま

たはTINUR受容体タンパク質をコードする遺伝子の発現レベルを上昇させる化合物のスクリーニング方法、

〔11〕 次の工程(1)～(3)を含む、アレルギー性疾患治療薬のための候補化合物をスクリーニングする方法、

- 5 (1) TR3またはTINUR受容体タンパク質と被験化合物を接触させる工程  
(2) TR3またはTINUR受容体タンパク質と被験化合物との結合活性を測定する工程

(3) TR3またはTINUR受容体タンパク質と結合する化合物を選択する工程

- 10 〔12〕 次の工程(1)～(4)を含む、アレルギー性疾患治療薬のための候補化合物をスクリーニングする方法、

(1) TR3もしくはTINUR受容体タンパク質、または該タンパク質のリガンド結合領域と転写調節領域結合タンパク質との融合タンパク質を発現し得るDNA、および該転写調節領域結合タンパク質の結合するDNA配列の下流にレポーター遺伝子が機能的に結合した構造を有するDNA、を導入した細胞を提供する工程

- 15 (2) 前記細胞と被験化合物を接触させる工程  
(3) 前記レポーター遺伝子の活性を測定する工程  
(4) 前記活性を変化させる化合物を選択する工程

〔13〕 〔10〕～〔12〕のいずれかに記載のスクリーニング方法によって得ることができる化合物を有効成分として含有する、アレルギー性疾患治療薬、

- 20 〔14〕 〔10〕～〔12〕のいずれかに記載のスクリーニング方法によって得ることができるシクロペンテノン構造を有するプロスタグランジンを含む有効成分として含有するアレルギー性疾患治療薬、

〔15〕 TR3もしくはTINUR受容体のリガンドを有効成分として含有するアレルギー性疾患治療薬、

- 25 〔16〕 TR3もしくはTINUR受容体のリガンドが、シクロペンテノン構造を有するプロスタグランジンである、〔15〕に記載のアレルギー性疾患治療薬、

- 〔17〕 シクロペンテノン構造を有するプロスタグランジンが、プロスタグランジン A<sub>2</sub>、プロスタグランジン A<sub>1</sub>、15-エピ プロスタグランジン A<sub>1</sub>、15(R)-15-メチル プロスタグランジン A<sub>2</sub>、16-フェノキシ テトラノール プロスタグランジン A<sub>2</sub>、1  
30 7-フェニル トリノール プロスタグランジン A<sub>2</sub>、15-デオキシ-デルタ 12, 14-プロスタグランジン A<sub>1</sub>、15 デオキシ-デルタ 12, 14-プロスタグランジン J<sub>2</sub>、および8-イソプロスタグランジン A<sub>1</sub>からなる群より選択される、〔16〕に記載のアレルギー性疾患治療薬、

- 〔18〕 TR3受容体のリガンドが、表14～49に掲載されたいずれかの化合物である、〔15〕に記載のアレルギー性疾患治療薬、  
35

〔19〕 アレルギー性疾患がアトピー性皮膚炎である、〔13〕～〔18〕のいずれかに記載の治療薬、

〔20〕 下記の（a）または（b）に記載のポリヌクレオチドの好酸球細胞における発現強度を低下させたトランスジェニック非ヒト脊椎動物からなるアレルギー性疾患モデル動物、

（a）TR3またはTINUR受容体タンパク質をコードするポリヌクレオチド

（b）TR3またはTINUR受容体タンパク質をコードするポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドであって、アトピー性皮膚炎患者の好酸球において発現が増加するタンパク質をコードするポリヌクレオチド

〔21〕 トランスジェニック動物が、ノックアウト動物である〔20〕に記載のモデル動物、

〔22〕 細胞におけるTR3またはTINUR受容体タンパク質を活性化させることを特徴とする、細胞のアポトーシス誘導方法、

〔23〕 〔10〕～〔12〕のいずれかに記載のスクリーニング方法によって得ることができる化合物またはシクロペンテノン構造を有するプロスタグランジンと、細胞を接触させる工程を含む、〔22〕に記載のアポトーシス誘導方法、

〔24〕 細胞が好酸球細胞である、〔22〕または〔23〕に記載のアポトーシス誘導方法、

〔25〕 〔10〕～〔12〕のいずれかに記載のスクリーニング方法によって得ることができる化合物またはシクロペンテノン構造を有するプロスタグランジンを含む、アポトーシス誘導剤、

〔26〕 TR3もしくはTINUR受容体のリガンドを有効成分として含有するアポトーシス誘導剤、

〔27〕 TR3もしくはTINUR受容体のリガンドが、シクロペンテノン構造を有するプロスタグランジンである、〔26〕に記載のアポトーシス誘導剤、

〔28〕 シクロペンテノン構造を有するプロスタグランジンが、シクロペンテノン構造を有するプロスタグランジンが、プロスタグランジン A<sub>2</sub>、プロスタグランジン A<sub>1</sub>、15-エピ プロスタグランジン A<sub>1</sub>、15(R)-15-メチル プロスタグランジン A<sub>2</sub>、16-フェノキシ テトラノール プロスタグランジン A<sub>2</sub>、17-フェニル トリノール プロスタグランジン A<sub>2</sub>、15-デオキシ-デルタ 12, 14-プロスタグランジン A<sub>1</sub>、15 デオキシ-デルタ 12, 14-プロスタグランジン J<sub>2</sub>、および 8-イソ プロスタグランジン A<sub>1</sub> からなる群より選択される、〔27〕に記載のアポトーシス誘導剤、

〔29〕 TR3受容体のリガンドが、表14～49に掲載されたいずれかの化合物である、〔26〕に記載のアポトーシス誘導剤、

〔30〕 好酸球CD30受容体のリガンドを含む、TR3もしくはTINUR遺伝子発現誘導剤、を提供するものである。

#### BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

5 図1は、表6をグラフ化した図である。

図2は、本発明者らによって構築されたTR3またはTINUR受容体のリガンド探索系を模式的に示す図である。XにTR3またはTINURのリガンド結合部位、Yにretinoic acid X receptor (RXR)  $\alpha$  の全長遺伝子を挿入する。これらをNIH3T3細胞に遺伝子導入し、誘導されてくるルシフェラーゼの活性を測定する。

10 図3は、TR3またはTINUR受容体タンパク質の構造を模式的に示す図である。

図4は、図2のシステムを用いたときの一連のシクロペンテノンプロスタグランジン群の、TR3の転写活性化作用を示す図である。

図5は、ABI7700で健常人と患者のTINUR遺伝子の発現量を測定した結果を示す図である。

15 図6は、図2のシステムを用いたときの一連のシクロペンテノンプロスタグランジン群の、TINUR遺伝子の転写活性化作用を示す図である。

図7は、ファーマコフォアモデルにより、PGA誘導体のTR3リガンド結合領域に対する結合位置をシミュレートした、アルファモデルにおけるプロスタグランジンA<sub>2</sub> (prostaglandin A<sub>2</sub> in alpha model) の図である。

20 図8は、LBD欠失変異体によるprostaglandin A<sub>2</sub>による転写活性低下の結果を示すグラフである。△LBDが欠失変異体である。

図9は、ピアコアS51を用いたTR3およびTINURのLBDにPGA1、PGA2の結合の様子を捉えた図である。GSTを比較対照として用いた。13,14-dihydro-15-keto-PGA2はネガティブコントロールとして使用した。

25 図10は、抗CD30抗体または抗Fas抗体によって、末梢血好酸球をアポトーシス刺激した場合のTR3の発現誘導結果を示すグラフである。beta-アクチン補正值、GAPDH補正值を示す。

図11は、抗CD30抗体または抗Fas抗体によって、末梢血好酸球をアポトーシス刺激した場合のTINURの発現誘導結果を示すグラフである。beta-アクチン補正值、GAPDH補正值を示す。

30 図12は、好酸球特異的細胞株であるAML14.3D10を抗CD30抗体、抗Fas抗体で処理した場合のアポトーシス誘導効果を示すグラフである。

図13は、好酸球特異的細胞株であるAML14.3D10を抗CD30抗体および抗Fas抗体で処理した場合のTR3の発現誘導を示すグラフである。

35 図14は、好酸球特異的細胞株であるAML14.3D10を抗CD30抗体および抗Fas抗体で処理した場合のTINURの発現誘導を示すグラフである。



図 1 5 は、TR3 および TINUR を含む核内受容体 Nur サブファミリーによる好酸球細胞死によるアレルギー疾患治療の作業仮説を示す図である。

#### DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

5 本発明者らは、TR3 または TINUR 遺伝子が、アトピー性皮膚炎の患者の好酸球において発現量が増加することを見出した。従って、TR3 または TINUR 遺伝子の発現レベルを指標することにより、被検者に対してアレルギー性疾患の検査を行うことができる。

10 本発明は、TR3 または TINUR 遺伝子の発現レベルを測定することを特徴とする、アレルギー性疾患の検査方法を提供する。

本発明の方法の好ましい態様においては、次の工程を含む。

(a) 被検者の好酸球細胞における、TR3 または TINUR 受容体タンパク質をコードする遺伝子の発現レベルを測定する工程

(b) 健常者の好酸球細胞における前記遺伝子の発現レベルと比較する工程

15 TR3 または TINUR 受容体は、3 つのサブファミリーを構成する核内オーファン受容体のそれぞれ  $\alpha$ 、 $\beta$  タイプである。表 1 に示すように核内オーファン受容体は種々の呼び名を持っており、本発明における「TR3 遺伝子」、「TINUR 遺伝子」とは、必ずしもヒト由来の遺伝子に限定して解されるべきではない。

表 1

	ヒ ト	マウス	ラット
$\alpha$	NAK-1(TR3)	nur77	NGFI-B
$\beta$	TINUR/NOT	Nurr1	RNR-1
$\gamma$	MINOR / CHN	TEC	NOR-1

25 これら TR3 または TINUR 受容体タンパク質のアミノ酸配列、およびそれぞれのタンパク質をコードする遺伝子の塩基配列に関する情報は、当業者においては公知の各種遺伝子データベース等から容易に取得することができる。具体的には、ヒト TR3 受容体タンパク質をコードする遺伝子 (TR3 遺伝子) の塩基配列を配列番号 : 1 に、ヒト TR3 受容体タンパク質のアミノ酸配列を配列番号 : 2 に示す。また、ヒト TINUR 受容体タンパク質をコードする遺伝子 (TINUR 遺伝子) の塩基配列を配列番号 : 3 に、ヒト TINUR 受容体タンパク質のアミノ酸配列を配列番号 : 4 に示す。

30 本発明において、アレルギー性疾患 (allergic disease) とはアレルギー反応の関与する疾患の総称である。より具体的には、アレルゲンが同定され、アレルゲンへの

曝露と病変の発症に深い結びつきが証明され、その病変に免疫学的な機序が証明されることと定義することができる。ここで、免疫学的な機序とは、アレルゲンの刺激によって白血球細胞が免疫応答を示すことを意味する。アレルゲンとしては、ダニ抗原や花粉抗原等を例示することができる。

- 5 代表的なアレルギー性疾患には、気管支喘息、アレルギー性鼻炎、アトピー性皮膚炎、花粉症、あるいは昆虫アレルギー等を示すことができる。アレルギー素因(alle  
rgic diathesis)とは、アレルギー性疾患を持つ親から子に伝えられる遺伝的な因子である。家族性に発症するアレルギー性疾患はアトピー性疾患とも呼ばれ、その原因となる遺伝的に伝えられる因子がアトピー素因である。アトピー性皮膚炎は、アトピー性疾患のうち、特に皮膚炎症状を伴う疾患に対して与えられた総称である。

- 10 本発明におけるアレルギー性疾患の検査とは、以下のような検査が含まれる。例えば、被検者がアレルギー性疾患を罹患しているか否かの検査、アレルギー性疾患を被り易い体質か否かの検査、またはアレルギー症状が改善に向かっているのかどうかを判断するための検査等が挙げられる。本発明の TR3 または TINUR 遺伝子は、アトピー性皮膚炎患者の活性化した好酸球で発現量の増加を示した。好酸球はアトピー性皮膚炎の代表的な臨床マーカーであることから、その減少と関連する臨床マーカーは、治療効果の判定に有用である。より具体的には、TR3 または TINUR 遺伝子の発現の上昇は、好酸球の減少を伴ってアレルギー性疾患の改善が進んでいることを示している。

- 15 アトピー性皮膚炎の重症度と好酸球数は相関しており、好酸球数を積極的に減らすことは治療につながる可能性がある。数の減少に伴って好酸球に特異的に誘導されてくるこの遺伝子を測定するとともに、細胞の外から積極的に誘導するような方法や物質を見つけ出せば、アトピー性皮膚炎の新しい治療法及びそれを評価するための診断法につながる可能性がある。

- 20 本発明において、TR3 または TINUR 遺伝子の発現レベルとは、該遺伝子の mRNA への転写、並びにタンパク質への翻訳を含む。従って、本発明によるアレルギー性疾患の検査方法は、該遺伝子に対応する mRNA の発現強度、あるいは該遺伝子によってコードされるタンパク質の発現レベルの比較に基づいて行われる。

- 25 本発明のアレルギー性疾患の検査方法における TR3 または TINUR 遺伝子の発現レベルの測定は、当業者においては、公知の遺伝子解析方法に従って実施することができる。具体的には、例えば TR3 または TINUR 遺伝子にハイブリダイズする核酸をプローブとしたハイブリダイゼーション技術、または本発明の遺伝子にハイブリダイズする DNA をプライマーとした遺伝子増幅技術等を利用することができる。

- 30 本発明のアレルギー性疾患検査用試薬として用いられるプローブまたはプライマーとしては、配列番号：1 または 3 に記載の塩基配列からなるポリヌクレオチド、またはその相補鎖に相補的な少なくとも 15 ヌクレオチドを含むポリヌクレオチドを挙げることができる。ここで「相補鎖」とは、A:T (RNA の場合は U)、G:C の塩基対から

なる2本鎖DNAの一方の鎖に対する他方の鎖を指す。また、「相補的」とは、少なくとも15個の連続したヌクレオチド領域で完全に相補配列である場合に限られず、少なくとも70%、好ましくは少なくとも80%、より好ましくは90%、さらに好ましくは95%以上の塩基配列上の相同性を有すればよい。塩基配列の相同性は、BLASTN等のアルゴリズムにより決定することができる。

このようなポリヌクレオチドは、本発明のタンパク質をコードするポリヌクレオチドを検出、単離するためのプローブとして、また、本発明のポリヌクレオチドを増幅するためのプライマーとして利用することが可能である。プライマーとして用いる場合には、通常、15bp~100bp、好ましくは15bp~35bpの鎖長を有する。また、プローブとして用いる場合には、本発明のポリヌクレオチドの少なくとも一部若しくは全部の配列を有し、少なくとも15bpの鎖長のDNAが用いられる。プライマーとして用いる場合、3'側の領域は相補的である必要があるが、5'側には制限酵素認識配列やタグなどを付加することができる。

なお、本発明における「ポリヌクレオチド」は、DNAあるいはRNAであることができる。これらポリヌクレオチドは、合成（単離）されたものでも天然のものでもよい。また、ハイブリダイゼーションに用いるプローブDNAは、通常、標識したものが用いられる。標識方法としては、例えば次のような方法を示すことができる。なお用語オリゴヌクレオチドは、ポリヌクレオチドのうち、重合度が比較的低いものを意味している。オリゴヌクレオチドは、ポリヌクレオチドに含まれる。

- ・DNAポリメラーゼIを用いるニックトランスレーションによる標識
- ・ポリヌクレオチドキナーゼを用いる末端標識
- ・クレノーフラグメントによるフィルイン末端標識 (Berger SL, Kimmel AR. (1987) Guide to Molecular Cloning Techniques, Method in Enzymology, Academic Press; Hames BD, Higgins SJ (1985) Genes Probes: A Practical Approach. IRL Press; Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. (1989) Molecular Cloning: a Laboratory Manual, 2nd Edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press)
- ・RNAポリメラーゼを用いる転写による標識 (Melton DA, Krieg, PA, Rebagliati M R, Maniatis T, Zinn K, Green MR. (1984) Nucleic Acid Res., 12, 7035-7056)
- ・放射性同位体を用いない修飾ヌクレオチドをDNAに取り込ませる方法 (Kricka LJ. (1992) Nonisotopic DNA Probing Techniques. Academic Press)

ハイブリダイゼーション技術を利用したアレルギー性疾患の検査は、例えば、ノーザンハイブリダイゼーション法、ドットブロット法、DNAマイクロアレイを用いた方法などを使用して行うことができる。さらには、RT-PCR法等の遺伝子増幅技術を利用することができる。RT-PCR法においては、遺伝子の増幅過程においてPCR増幅モニター法を用いることにより、本発明の遺伝子の発現について、より定量的な解析を行うことが可能である。

PCR 遺伝子増幅モニター法においては、両端に互いの蛍光を打ち消し合う異なった蛍光色素で標識したプローブを用い、検出対象（DNA もしくは RNA の逆転写産物）にハイブリダイズさせる。PCR 反応が進んで Taq ポリメラーゼの 5'-3' エクソヌクレアーゼ（exonuclease）活性により同プローブが分解されると二つの蛍光色素が離れ、  
5 蛍光が検出されるようになる。この蛍光の検出をリアルタイムに行う。検出対象についてコピー数の明らかな標準試料について同時に測定することにより、PCR 増幅の直線性のあるサイクル数で目的試料中の検出対象のコピー数を決定する（Holland, P. M. et al., 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:7276-7280; Livak, K. J. et al., 1995, PCR Methods and Applications 4(6):357-362; Heid, C. A. et al.,  
10 Genome Research 6:986-994; Gibson, E. M. U. et al., 1996, Genome Research 6:995-1001）。PCR 増幅モニター法においては、例えば、ABI PRISM7700（PE バイオシステムズ社）を用いることができる。

また本発明のアレルギー性疾患の検査方法は、TR3 または TINUR 遺伝子によりコードされるタンパク質を検出することにより行うこともできる。このような検査方法として、例えば、該遺伝子によってコードされるタンパク質に結合する抗体を利用したウェスタンブロッティング法、免疫沈降法、ELISA 法などを利用することができる。

この検出に用いる TR3 または TINUR タンパク質に結合する抗体は、当業者に周知の技法を用いて得ることができる。本発明に用いる抗体は、ポリクローナル抗体、あるいはモノクローナル抗体（Milstein C, et al., 1983, Nature 305(5934): 537-4  
20 0) であることができる。例えば、本発明のタンパク質に対するポリクローナル抗体は、抗原を感作した哺乳動物の血液を取り出し、この血液から公知の方法により血清を分離する。ポリクローナル抗体としては、ポリクローナル抗体を含む血清を使用することができる。あるいは必要に応じてこの血清からポリクローナル抗体を含む画分をさらに単離することもできる。また、モノクローナル抗体を得るには、上記抗原を  
25 感作した哺乳動物から免疫細胞を取り出して骨髄腫細胞などと細胞融合させる。こうして得られたハイブリドーマをクローニングして、その培養物から抗体を回収しモノクローナル抗体とすることができる。

TR3 または TINUR タンパク質の検出には、これらの抗体を適宜標識して用いればよい。また、この抗体を標識せずに、該抗体に特異的に結合する物質、例えば、プロテイン A やプロテイン G を標識して間接的に検出することもできる。具体的な検出方法としては、例えば、ELISA 法を挙げることができる。

抗原に用いるタンパク質もしくはその部分ペプチドは、例えば TR3 または TINUR 遺伝子、もしくはその一部を発現ベクターに組み込み、これを適当な宿主細胞に導入して、形質転換体を作成し、該形質転換体を培養して組み換えタンパク質を発現させ、  
35 発現させた組み換えタンパク質を培養体または培養上清から精製することにより得ることができる。あるいは、TR3 または TINUR 遺伝子によってコードされるアミノ酸配

列の部分アミノ酸配列からなるオリゴペプチドを化学的に合成し、免疫原として用いることもできる。

- 本発明においては、被検者の好酸球細胞を試料とすることが好ましい。好酸球細胞は、末梢血から公知の方法によって調製することができる。すなわち、例えばヘパリン採血した血液を遠心分離によって分画し、白血球細胞を分離する。次に白血球細胞から、フィコールによる遠心分離等によって顆粒球細胞を分取し、更に CD16 抗体を用いた好中球のディプリーション等によって好酸球細胞を分離することができる。分離された好酸球を破壊してライセートとすれば、前記タンパク質の免疫学的な測定のための試料とすることができる。あるいはこのライセートから mRNA を抽出すれば、前記遺伝子に対応する mRNA の測定のための試料とすることができる。好酸球のライセートや mRNA の抽出には、市販のキットを利用すると便利である。

- あるいは、好酸球の分離を行わず、全血や、末梢血白血球集団を対象として、本発明において指標とすべき遺伝子の発現レベルを測定しても良い。この場合には、測定値の補正を行うことによって、細胞における遺伝子の発現レベルの変化を求めることができる。例えば好酸球に特異的に発現し、かつ細胞の状態にかかわらず発現レベルが大きく変動しない遺伝子（ハウスキーピング遺伝子）の発現レベルの測定値に基づいて、本発明において指標とすべき遺伝子の発現レベルの測定値を補正することができる。

- また検出すべきタンパク質が分泌型のタンパク質である場合には、被検者の血液や血清などの体液試料に含まれる目的とするタンパク質の量を測定することによって、それをコードする遺伝子の発現レベルの比較が可能である。

本発明によるアレルギー性疾患の検査の結果、特にアトピー性皮膚炎等のアレルギー性疾患の患者において本発明の遺伝子の発現レベルが上昇している場合に、好酸球の減少を伴ってアレルギー症状の改善が進んでいるものと推定される。

- また本発明は、下記の（a）または（b）に記載のポリヌクレオチドの好酸球細胞における発現レベルを低下させたトランスジェニック非ヒト動物からなるアレルギー性疾患モデル動物に関する。

（a）TR3 または TINUR 受容体タンパク質をコードするポリヌクレオチド。

- （b）TR3 または TINUR 受容体タンパク質をコードするポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドであって、アトピー性皮膚炎患者の好酸球において発現が増加するタンパク質をコードするポリヌクレオチド。

- 本発明において、発現レベルの低下とは、遺伝子の機能を実質的に消失させたノックアウト状態が含まれる。本発明において、遺伝子の機能が実質的に消失した状態とは、遺伝子の発現や、この遺伝子によってコードされるタンパク質の活性を見出すことができない状態を言う。遺伝子の発現レベルは、例えば実施例に示すような定量的

な PCR により確認することができる。また翻訳産物であるタンパク質の活性が実質的に見出せないことは、正常な状態と比較することにより確認することができる。

このようなトランスジェニック動物には、例えば遺伝子のコード領域に変異を導入し、人為的にアミノ酸配列の変異や終止コドンを生じさせて、本来のタンパク質の活性を発現できない状態とした動物などを示すことができる。アミノ酸配列の変異には、置換、欠失、挿入、あるいは付加を示すことができる。その他、遺伝子の転写調節領域を変異させることにより、本発明の遺伝子の発現そのものを調節することもできる。

特定の遺伝子を対象として、トランスジェニック動物を得る方法は公知である。すなわち、遺伝子と卵を混合してリン酸カルシウムで処理する方法や、位相差顕微鏡下で前核期卵の核に、微小ピペットで遺伝子を直接導入する方法（マイクロインジェクション法、米国特許第 4873191 号）、胚性幹細胞（ES 細胞）を使用する方法などによってトランスジェニック動物を得ることができる。その他、レトロウィルスベクターに遺伝子を挿入し、卵に感染させる方法、また、精子を介して遺伝子を卵に導入する精子ベクター法等も開発されている。精子ベクター法とは、精子に外来遺伝子を付着またはエレクトロポレーション等の方法で精子細胞内に取り込ませた後に、卵子に受精させることにより、外来遺伝子を導入する遺伝子組換え法である（M. Lavitran oet ら Cell, 57, 717, 1989）。

本発明のトランスジェニック動物は、ヒト以外のあらゆる脊椎動物を利用して作成することができる。具体的には、マウス、ラット、ウサギ、ミニブタ、ヤギ、ヒツジ、あるいはウシ等の脊椎動物において様々な遺伝子の導入や発現レベルを改変されたトランスジェニック動物が作り出されている。

本発明のトランスジェニック動物には、例えば、ヒト TR3 または TINUR 遺伝子（それぞれ配列番号：1 または 3 に記載）の非ヒト動物種におけるホモログの発現が抑止されたノックアウト動物が含まれる。ノックアウト動物の表現型を観察することにより、ノックアウトした遺伝子の働きを具体的に知ることができる。配列番号：1 または 3 に示す塩基配列からなる遺伝子は、ヒトにおいてアトピー皮膚炎患者の好酸球中で発現が上昇していた。従って、そのホモログをノックアウトした動物は、アレルギー性疾患のモデル動物として有用である。

例えば、本発明によるノックアウト動物が皮膚炎を発症したり、何らかのアレルギー性疾患に関連した測定値の変化を示せば、それを回復させる作用を持った化合物を探索するスクリーニングシステムが構築できる。

ノックアウト動物の作製方法は公知である。例えばマウスにおいて、胚性幹細胞を用いて相同組換えを行い、一方の対立遺伝子を改変・破壊した胚性幹細胞を選別し、ノックアウト動物を作製する方法が公知である。例えば、受精卵に遺伝子を操作した胚性幹細胞を注入して、胚性幹細胞由来の細胞と胚由来の細胞が混ざったキメラ動物を得る。このキメラ動物（キメラとは、2 個以上の受精卵に基づいた体細胞で形成さ

れる単一個体をいう)と正常マウスを交配すると、一方の対立遺伝子の全てが改変・破壊されたヘテロ接合体を作製することができる。さらに、ヘテロ接合体同士を交配すれば、ホモ接合体が作製できる。本発明によるトランスジェニック動物は、これらヘテロ接合体と、ホモ接合体のいずれをも含む。

- 5 相同組換えとは、遺伝子組換え機構で塩基配列が同じ、または非常に類似している2つの遺伝子間で起こる組換えのことをいう。相同組換えを起こした細胞の選別にはPCRを使用することができる。挿入遺伝子の一部と挿入が期待される領域の一部をプライマーとして使ったPCR反応を行い、増幅産物ができた細胞で相同組換えを起こしていることが判明する。また、胚幹細胞で発現している遺伝子に相同組み換えを起こさせる場合には、導入遺伝子にネオマイシン耐性遺伝子を結合させておき、導入後に細胞をネオマイシン耐性にさせることにより選択することができる等、公知の方法およびそれらの変法を用いて容易に選択することができる。
- 10

- 本発明によるトランスジェニック動物は、後に述べるアレルギー性疾患の治療または予防のための医薬品のスクリーニングに加えて、アレルギー性疾患のメカニズムの
- 15 解明、さらにはスクリーニングされた化合物の安全性の試験に有用である。

- 本発明によって、TR3 または TINUR 遺伝子の発現レベルがアトピー性皮膚炎患者の好酸球において、上昇することが明らかとなった。これは、病態に伴って末梢血で増加する好酸球を減少させなければならないというネガティブフィードバック制御が働くためと考えられる。従って、好酸球細胞において TR3 または TINUR 遺伝子、また
- 20 はこれらの遺伝子と機能的に同等な遺伝子の発現レベルを人為的に低下させた動物は、アレルギー性疾患のモデル動物として利用することができる。なお好酸球における発現レベルの低下とは、白血球集団全体における前記遺伝子の発現レベルの低下を含む。すなわち、前記遺伝子の発現レベルを低下させるのは好酸球のみである場合のみならず、白血球集団全体において前記遺伝子の発現レベルが低下している場合を含む。本
- 25 発明において機能的に同等な遺伝子とは、通常、前記(a)または(b)に記載した遺伝子のいずれかを意味する。より具体的には、本発明における機能的に同等な遺伝子として、TR3 または TINUR をコードする遺伝子とストリンジェントな条件でハイブリダイズする遺伝子も挙げられる。本発明におけるストリンジェントな条件として、一般的には以下のような条件を示すことができる。例えば、4xSSC、65℃でハイブリ
- 30 ダイゼーションさせ、0.1xSSCを用いて65℃で1時間洗浄する。ストリンジェンシーを大きく左右するハイブリダイゼーションや洗浄の温度条件は、融解温度(T<sub>m</sub>)に応じて調整することができる。T<sub>m</sub>はハイブリダイズする塩基対に占める構成塩基の割合、ハイブリダイゼーション溶液組成(塩濃度、ホルムアミドやドデシル硫酸ナトリウム濃度)によって変動する。従って当業者であれば、これらの条件を考慮して
- 35 同等のストリンジェンシーを与える条件を実験または経験的に設定することができる。

本発明におけるモデル動物には、例えば前記トランスジェニック動物等を利用することができる。

- 更に本発明は、候補化合物が本発明のポリヌクレオチドの発現レベルに与える影響を検出する方法を提供する。本発明において、TR3 または TINUR 遺伝子は、アトピー性皮膚炎患者の好酸球において有意に発現レベルが上昇している。これは、病態に伴って末梢血で増加する好酸球を減少させなければならないというネガティブフィードバック制御が働くためと考えられる。従って、これらの遺伝子の発現レベルに与える影響を検出する方法に基づいて、その発現レベルを上昇させることができる化合物を選択することによって、アレルギー性疾患の治療薬を得ることができる。本発明において遺伝子の発現レベルを上昇させる化合物とは、遺伝子の転写、翻訳、タンパク質の活性発現のいずれかのステップを誘導する作用を持つ化合物である。本発明はさらに、TR3 または TINUR 遺伝子の発現レベルに加えて、TR3 または TINUR 遺伝子産物タンパク質の活性（転写活性化能）を検出する方法を提供するとともに、TR3 または TINUR 遺伝子産物タンパク質の活性（転写活性化能）を上昇させる化合物を選択することによって、アレルギーの治療薬を得ることができる。

- 候補化合物が本発明のポリヌクレオチドの発現レベルに与える影響の検出方法は、*in vivo*で行うことも *in vitro*で行うこともできる。*in vivo*での影響を検出するには、適当な被検動物を利用する。被検動物には、例えばアレルギー性疾患モデル動物や、前記（a）または（b）に記載の遺伝子の好酸球細胞における発現が抑制されたトランスジェニック非ヒト動物からなるアレルギー性疾患モデル動物を利用することができる。本発明に基づく *in vivo*での発現レベルに与える影響の検出は、例えば以下のような工程に従って実施することができる。

- （1）被検動物に候補化合物を投与する工程
- （2）被検動物の好酸球細胞における前記（a）または（b）に記載のポリヌクレオチドの発現レベルを測定する工程

- 本発明の検出方法における被検動物としては、例えば、TR3 または TINUR 遺伝子のアンチセンスを発現させることにより TR3 または TINUR 遺伝子の発現を低下させたトランスジェニック動物を利用することができる。このようなトランスジェニック動物は、例えば以下のようにして作成することができる。すなわち、まず TR3 または TINUR 遺伝子の配列の全長配列、あるいは部分配列を、適当なプロモーター配列の下流に逆向きの方向で組み込み、アンチセンス RNA 発現ベクターを構築する。この発現ベクターを核へ導入すれば、TR3 または TINUR 遺伝子のアンチセンスを発現し、TR3 または TINUR 遺伝子の発現が低下したトランスジェニック動物を得ることができる。発現ベクターに使用するプロモーターとして、適当な薬剤等の物質により転写が調節されるプロモーターを用いれば、該物質の投与によってトランスジェニック動物における TR3 または TINUR 遺伝子の発現レベルを調整することができる。



このようにして TR3 または TINUR 遺伝子の発現を低下させたモデル動物に薬剤候補化合物を投与し、モデル動物の好酸球における TR3 または TINUR 遺伝子の発現に対する化合物の作用をモニターすることにより、TR3 または TINUR 遺伝子の発現レベルに与える薬剤候補化合物の影響を検出することができる。

- 5     本発明のスクリーニング方法により、TR3 または TINUR 遺伝子の発現に様々な形で関与する薬剤を選択することができる。具体的には、例えば次のような作用点を持つ薬剤候補化合物を見出すことができる。

- TR3 または TINUR 遺伝子の発現をもたらすシグナル伝達経路の活性化
- TR3 または TINUR 遺伝子の転写活性の上昇

- 10    • TR3 または TINUR 遺伝子の転写産物の安定化もしくは分解の阻害、等

また、*in vitro* においては、例えば、前記 (a) または (b) に記載した遺伝子を発現する細胞に候補化合物を接触させ、前記遺伝子の発現レベルを検出する方法を利用することができる。具体的には、例えば以下のような工程に従って実施することができる。

- 15    (1) 前記 (a) または (b) に記載したポリヌクレオチドを発現する細胞に候補化合物を接触させる工程

(2) 前記 (a) または (b) に記載したポリヌクレオチドの発現レベルを測定する工程

- 20    本発明において、工程 (1) に用いるための細胞は、これらポリヌクレオチドを適当な発現ベクターに挿入し、該ベクターを適当な宿主細胞に導入することにより得ることができる。利用できるベクター、および宿主細胞は、本発明の遺伝子を発現し得るものであればよい。宿主-ベクター系における宿主細胞としては、大腸菌、酵母、昆虫細胞、動物細胞等が例示でき、それぞれ利用できるベクターを適宜選択することができる。

- 25    ベクターの宿主への導入方法としては、生物学的方法、物理的方法、化学的方法などを示すことができる。生物学的方法としては、例えば、ウイルスベクターを使用する方法、特異的受容体を利用する方法、細胞融合法 (HVJ (センダイウイルス)、ポリエチレングリコール (PEG)、電気的細胞融合法、微量核融合法 (染色体移入)) が挙げられる。また、物理的方法としては、マイクロインジェクション法、エレクトロポレーション法、ジーンパーティクルガン (gene gun) を用いる方法が挙げられる。化学的方法としては、リン酸カルシウム沈殿法、リポソーム法、DEAE デキストラン法、プロトプラスト法、赤血球ゴースト法、赤血球膜ゴースト法、マイクロカプセル法が挙げられる。

- 35    本発明の検出方法においては、前記 (a) または (b) に記載したポリヌクレオチドを発現する細胞として、株化白血球細胞を用いることもできる。株化白血球細胞としては、Eo1、YY-1、HL-60、TF-1、および AML14. 3D10 など白血球由来の株化細胞を

例示できる。白血球細胞株の中でも、好酸球に由来する細胞株は、本発明の検出方法に好適である。好酸球に由来する細胞株としては、例えば、Eol、YY-1、AML14.3D10等を挙げることができる。

Eol(Eol-1: Saito H et al, Establishment and characterization of a new human eosinophilic leukemia cell line. Blood 66, 1233-1240, 1985)は、林原研究所より入手することができる。同様に YY-1(Ogata N et al, The activation of the JAK2/STAT5 pathway is commonly involved in signaling through the human IL-5 receptor. Int.Arch. Allergy Immunol., Suppl 1, 24-27, 1997)は、サイトシグナル研究所より分与される。また AML14.3D10(Baumann MA et al, The AML14 and AML14.3D10 cell lines: a long-overdue model for the study of eosinophils and more. Stem Cells, 16, 16-24, 1998)は、米国オハイオ州、Research Service, VA Medical Center Dayton の Paul CC より、商業的に入手可能である。

その他、未分化白血球細胞株である HL-60 クローン 15(ATCC CRL-1964)は、酪酸存在下で1週間程度培養すれば、好酸球に分化し好酸球細胞株とすることができる。

好酸球であることは、形態的に、多形核で好酸球顆粒が認められることにより判別することができる。形態的な観察は、ギムザ染色やディフクイック染色によって行われる。一般に、好酸球を含むヒト白血球細胞株は、白血病の患者サンプルから不死化した細胞をクローニングすることにより樹立することができる。従って、当業者は、必要に応じて好酸球細胞株を公知の方法によって得ることもできる。このスクリーニング方法においては、まず前記株化白血球細胞に候補化合物を添加する。その後、該株化白血球細胞における前記 (a) または (b) に記載のポリヌクレオチドの発現レベルを測定し、該遺伝子の発現レベルを上昇させる化合物を選択する。

*in vitro* における検出方法のための細胞として、前記 (a) または (b) に記載したポリヌクレオチドの発現を調節した形質転換細胞を用いることができる。このような形質転換細胞としては、例えば当該ポリヌクレオチドのアンチセンス発現ベクターを形質転換した細胞を挙げることができる。アンチセンス発現ベクターによる形質転換細胞は、前記トランスジェニック動物の作成と同様の原理によって得ることができる。得られた形質転換細胞を用いて該遺伝子の発現レベルに与える候補化合物の影響を検出することもできる。

なお本発明の方法において、前記 (a) または (b) に記載のポリヌクレオチドの発現レベルは、これらの遺伝子がコードするタンパク質の発現レベルのみならず、対応する mRNA を検出することにより比較することもできる。mRNA によって発現レベルの比較を行うには、タンパク質試料の調製工程に代えて、先に述べたような mRNA 試料の調製工程を実施する。mRNA やタンパク質の検出は、先に述べたような公知の方法によって実施することができる。

さらに TR3 または TINUR 遺伝子の転写調節領域を取得し、レポーターアッセイ系を構築することができる。レポーターアッセイ系とは、転写調節領域の下流にこの転写調節領域の制御下に発現するレポーター遺伝子の発現量を指標として、該転写調節領域に作用する転写調節因子をスクリーニングするアッセイ系をいう。

- 5 転写調節領域としては、プロモーター、エンハンサー、さらには、通常プロモーター領域に見られる CAAT ボックス、TATA ボックス等を例示することができる。またレポーター遺伝子として、CAT(chloramphenicol acetyltransferase)遺伝子、ルシフェラーゼ(luciferase)遺伝子、成長ホルモン遺伝子等を利用することができる。

- 10 TR3 または TINUR 遺伝子の転写調節領域は、当業者においては、一般的な方法、例えば、以下の方法により取得することができる。まず、配列番号：1 または 3 に記載された塩基配列に基づいて、BAC ライブラリー、YAC ライブラリー等のヒトゲノム DNA ライブラリーから、PCR またはハイブリダイゼーションを用いる方法によりスクリーニングを行い、該 cDNA の配列を含むゲノム DNA クローンを得る。得られたゲノム DNA の配列を基に、TR3 または TINUR 遺伝子の転写調節領域を推定し、該転写調節領域
- 15 域を取得する。得られた転写調節領域を、レポーター遺伝子上流に位置するようにクローニングしてレポーターコンストラクトを構築する。得られたレポーターコンストラクトを培養細胞株に導入してスクリーニング用の形質転換体とする。この形質転換体に候補化合物を接触させ、レポーター遺伝子の発現を検出することによって、転写調節領域に対する候補化合物の作用を評価することができる。

- 20 本発明の前記ポリヌクレオチドの発現レベルに与える影響を検出する方法に基づいて、前記ポリヌクレオチドの発現レベルを変化させる化合物のスクリーニングを行うことができる。本発明は、次の工程を含む前記 (a) または (b) に記載のポリヌクレオチドの発現レベルを変化させる化合物のスクリーニング方法に関する。

- すなわち本発明は、*in vivo* および/または *in vitro* において、候補化合物による前記ポリヌクレオチドの発現レベルに与える影響を検出し、対照と比較して前記発現レベルを上昇させる化合物を選択する工程を含む、前記 (a) または (b) に記載のポリヌクレオチドの発現レベルを上昇させる化合物のスクリーニング方法を提供する。
- 25

- あるいは本発明は、TR3 または TINUR 遺伝子の転写調節領域を利用するレポーターアッセイによる、転写調節領域に作用する化合物のスクリーニング方法に関する。本発明によるレポーターアッセイの結果に基づいて、対象と比較してレポーター遺伝子の発現を上昇させる化合物を選択することにより、TR3 または TINUR 遺伝子の発現を誘導する化合物を取得することができる。あるいは、リガンド結合領域に結合するアゴニストまたはアンタゴニストのスクリーニング方法に関する。
- 30

- 35 本発明者らによってアレルギー性疾患に関連するタンパク質として見出された TR3 または TINUR 受容体タンパク質は、オーファン受容体であり生体内リガンド活性物

質はこれまでのところ見つかっていない。TR3 または TINUR タンパク質のリガンド活性物質は、好酸球細胞内でダイレクトにそれぞれ TR3 または TINUR を活性化し、アポトーシスを促進させるものと考えられる。従って、TR3 または TINUR 受容体のリガンド活性物質はアレルギー性疾患治療薬となるものと期待される。通常、受容体タンパク質と結合し得る化合物の探索を行うことにより、該受容体のリガンドを取得することが可能である。

5 本発明は、TR3 または TINUR タンパク質と結合し得る化合物を選択することを特徴とする、アレルギー性疾患治療薬のための候補化合物のスクリーニング方法を提供する。本方法においては、TR3 または TINUR 受容体タンパク質と被験化合物を接触させ、  
10 次いで、それぞれの受容体タンパク質と被験化合物との結合活性を測定し、それぞれの受容体タンパク質と結合する化合物を選択する。また、単に結合をするのみでなく、TR3 または TINUR の転写活性を測定し、アゴニスト、アンタゴニストを選択する。

本方法における TR3 または TINUR 受容体タンパク質には、それぞれその部分ペプチドも含まれる。上記方法における TR3 または TINUR 受容体タンパク質と被検化合物との結合活性の測定は、当業者においては公知の方法を利用して実施することができる。

例えば、TR3 または TINUR と結合する化合物がタンパク質である場合には、本発明のスクリーニング方法は、ウエストウエスタンブロッティング法により行うことができる。具体的には、TR3 または TINUR タンパク質と結合するタンパク質（被検タンパク質）を発現していることが予想される組織または細胞よりファージベクター（ $\lambda$ gt11, ZAPII など）を用いた cDNA ライブラリーを作製し、これを LB-アガロース上で発現させフィルターに発現させたタンパク質を固定する。次いで、TR3 または TINUR タンパク質をビオチンラベル化、あるいは GST タンパク質との融合タンパク質として精製し、これを上記フィルターと反応させ、被検タンパク質を発現しているプ  
20 ラークを、ストレプトアビジンや抗 GST 抗体などにより検出を行うことにより、結合活性を評価することができる。

また、本発明のアレルギー性疾患治療薬のための候補化合物のスクリーニング方法の別の態様においては、下記の工程を含む。

（１）TR3 もしくは TINUR 受容体タンパク質、または該タンパク質のリガンド結合領域と転写調節領域結合タンパク質との融合タンパク質を発現し得る DNA、および該転写調節領域結合タンパク質の結合する DNA 配列の下流にレポーター遺伝子が機能的に結合した構造を有する DNA、を導入した細胞を提供する工程  
30

（２）前記細胞と被検化合物を接触させる工程

（３）前記レポーター遺伝子の活性を測定する工程

35 （４）前記活性を変化させる化合物を選択する工程

上記方法における「機能的に結合した」とは、TR3 もしくは TINUR 受容体タンパク質、または該タンパク質のリガンド結合領域が、該受容体タンパク質のリガンドもしくはリガンド様化合物と結合した際に、レポーター遺伝子が発現し得るように結合した状態を指す。上記方法における「転写調節領域結合タンパク質」としては、通常、

5 GAL4 タンパク質を好適に使用することができる。また、上記「転写調節領域結合タンパク質の結合し得る DNA 配列」としては、例えば、GAL4 結合 DNA 領域を挙げることができる。さらに本発明の上記スクリーニング方法は、ハイスループットで行うことが可能である。

また、本発明のスクリーニング方法の好ましい態様としては、「two ハイブリッド

10 システム」（例えば、「MATCHMARKER Two-Hybrid System」, 「Mammalian MATCHMAKER Two-Hybrid Assay Kit」, 「MATCHMAKER One-Hybrid System」(いずれも clontech 社製)、「HybriZAP Two-Hybrid Vector System」(stratagene 社製)、文献「Dalton S, and Treisman R (1992)Characterization of SAP-1, a protein recruited by

15 serum response factor to the c-fos serum response element. Cell 68, 597-612」)を用いてスクリーニングを行うことができる。本発明の上記方法は、より具体的には、以下のようにして実施することができるが、この方法に特に限定されず、当業者においては、以下に例示した方法を適宜改変して実施することが可能である。

two-ハイブリッドシステムにおいては、TR3 または TINUR タンパク質、あるいはその部分ペプチドを、通常、GAL4 DNA 結合領域と融合させて酵母細胞の中で発現させ、

20 TR3 または TINUR タンパク質、あるいはその部分ペプチドと結合するタンパク質を発現していることが予想される細胞より、VP16 または GAL4 転写活性化領域と融合する形で発現するような cDNA ライブラリーを作製し、これを上記酵母細胞に導入し、検出された陽性クローンからライブラリー由来 cDNA を単離する(酵母細胞内で TR3 または TINUR タンパク質、あるいはそのリガンド結合領域を含む部分ペプチドと結合

25 するタンパク質が発現すると、両者の結合によりレポーター遺伝子が活性化され、陽性のクローンが確認できる)。単離した cDNA を大腸菌に導入して発現させることにより、該 cDNA がコードするタンパク質を得ることができる。これにより TR3 または TINUR タンパク質、あるいはその部分ペプチドに結合するタンパク質もしくはその遺伝子を調製することが可能である。two ハイブリッドシステムにおいて用いられるレ

30 ポーター遺伝子としては、例えば、HIS3 遺伝子の他、Ade2 遺伝子、LacZ 遺伝子、CAT 遺伝子、ルシフェラーゼ遺伝子、PAI-1 (Plasminogen activator inhibitor type 1) 遺伝子等が挙げられるが、これらに制限されない。two ハイブリッド法によるスクリーニングは、酵母の他、哺乳動物細胞等を使って行うこともできる。

本発明者らは、哺乳動物細胞を用いた two ハイブリッドシステムを応用して、TR3

35 または TINUR タンパク質の転写活性化機能を上昇させるリガンドをスクリーニングすることが可能なハイスループット系を構築した。この系は、従来の哺乳動物におけ

る two ハイブリッドシステムを改良したものであり、この系の概略を図 2 に示す  
(詳細は後述の実施例を参照)。

本発明のスクリーニング方法は、好ましくは、上記の本発明者らによって開発された  
ハイスループット系を用いて行うことができる。

- 5      TR3 または TINUR は、アトピー性皮膚炎末梢血のような白血球が機能亢進した状態  
で発現誘導され、その結果として細胞にアポトーシスが誘導される可能性が高い。生  
体内に存在するリガンドは、核内受容体が高発現している場所に存在する可能性があ  
る。そこで本発明者らは、このような条件で産生されると予想される低分子の脂溶性  
10      メディエーターをリガンド候補被検化合物として、上記の方法によりスクリーニング  
を行った。そして本発明者らは、脂溶性メディエーターの中から、リガンド活性物質  
として、TR 3 についてはプロスタグランジン  $A_2$  (prostaglandin  $A_2$ )、プロスタグ  
ランジン  $A_1$  (prostaglandin  $A_1$ )、15-エピ プロスタグランジン  $A_1$  (15-epi prosta  
glandin  $A_1$ )、15(R)-15-メチル プロスタグランジン  $A_2$  (15(R)-15-methyl prostag  
landin  $A_2$ )、16-フェノキシ テトラノル プロスタグランジン  $A_2$  (16-phenoxy tetra  
15      nor prostaglandin  $A_2$ )、17-フェニル トリノル プロスタグランジン  $A_2$  (17-phenyl  
trinor prostaglandin  $A_2$ )、15-デオキシ-デルタ 12, 14-プロスタグランジン  $A_1$  (1  
5-deoxy-delta12, 14-prostaglandin  $A_1$ )、15 デオキシ-デルタ 12, 14-プロスタグ  
ランジン  $J_2$  (15 deoxy-delta12, 14-prostaglandin  $J_2$ )、8-イソ プロスタグランジン  $A_1$   
(8-iso prostaglandin  $A_1$ )、T I N U R についてはプロスタグランジン  $A_2$ 、プロス  
20      タグランジン  $A_1$ 、15-エピ プロスタグランジン  $A_1$ 、15(R)-15-メチル プロスタグ  
ランジン  $A_2$ 、16-フェノキシ テトラノル プロスタグランジン  $A_2$ 、17-フェニル トリ  
ノル プロスタグランジン  $A_2$ 、15 デオキシ-デルタ 12, 14-プロスタグランジン  $J_2$ 、  
8-イソ プロスタグランジン  $A_1$  等を取得することに成功した。これらの化合物は、シ  
クロペンテノン構造を有するプロスタグランジンである。このことは、本発明の方法  
25      によって TR3 または TINUR の転写活性化機能をアップレギュレートするリガンド活  
性物質を実際に取得することが可能であることを示すものである。

- TR3 または TINUR タンパク質と結合する化合物のスクリーニングは、アフィニティ  
クロマトグラフィーを用いて行うこともできる。例えば、TR3 または TINUR タンパ  
ク質をアフィニティカラムの担体に固定し、ここに TR3 または TINUR タンパク質  
30      と結合するタンパク質を発現していることが予想される被検試料を適用する。この場  
合の被検試料としては、例えば細胞抽出物、細胞溶解物等が挙げられる。被検試料を  
適用した後、カラムを洗浄し、TR3 または TINUR タンパク質と結合したタンパク質を  
調製することができる。

- 取得したタンパク質は、例えば、該タンパク質のアミノ酸配列を分析し、それを基  
35      にオリゴ DNA を合成し、該 DNA をプローブとして cDNA ライブラリーをスクリーニ  
ングすることにより、該タンパク質をコードする DNA を得ることができる。

本発明において、結合した化合物を検出または測定する手段として表面プラズモン共鳴現象を利用したバイオセンサーを使用することもできる。表面プラズモン共鳴現象を利用したバイオセンサーは、TR3 または TINUR タンパク質と被検化合物との間の相互作用を、表面プラズモン共鳴シグナルとしてリアルタイムに観察することが可能である（例えば BIAcore、Pharmacia 製）。従って、BIAcore 等のバイオセンサーを用いることにより TR3 または TINUR タンパク質と被検化合物との結合を評価することが可能である。

TR3 または TINUR タンパク質と結合する化合物を単離することは、当業者においては通常行い得ることである。上記以外の方法として、例えば、固定した TR3 または TINUR タンパク質に、合成化合物、天然物バンク、もしくはランダムファージペプチドディスプレイライブラリーを作用させ、本発明のタンパク質に結合する分子をスクリーニングする方法等を示すことができる。

本発明による、候補化合物の TR3 または TINUR 遺伝子の発現レベルや転写活性化機構に与える影響を検出する方法に用いられる細胞、並びに該遺伝子の発現レベルを調べるためのポリヌクレオチド、あるいは抗体を組み合わせ、この方法のための検出用キットとすることができる。キットには、陽性対照や陰性対照として用いられる候補化合物や指示書を組み合わせることもできる。本発明に基づく候補化合物の TR3 または TINUR 遺伝子の発現レベルや転写活性化機構に与える影響を検出するためのキットは、例えば、TR3 または TINUR 遺伝子の発現レベルや転写活性化機構を修飾する化合物のスクリーニング用キットとして利用することができる。

本発明のスクリーニング方法に用いる被検候補化合物としては、特に制限されないが、例えば、ステロイド誘導体等既存の化学的方法により合成された化合物標品、コンビナトリアルケミストリーにより合成された化合物標品、動・植物組織の抽出物もしくは微生物培養物等の複数の化合物を含む混合物、精製タンパク質、遺伝子ライブラリーの発現産物、合成ペプチドのライブラリー等が挙げられる。また、本発明の TR3 または TINUR タンパク質と結合する化合物のスクリーニング方法においては、特に制限されないが、低分子の脂溶性メディエーターを被検候補化合物とすることが好ましい。

本発明のスクリーニング方法によって選択される化合物は、アレルギー性疾患の治療薬として有用である。TR3 または TINUR 遺伝子は、アトピー性皮膚炎患者の好酸球において発現が増加する。このような好酸球増多の病態においてこれらのアポトーシス関連遺伝子が誘導されるのは、末梢血で増加する好酸球を減少させなければならないというネガティブフィードバック制御が働くためと考えられる。従って、これらの遺伝子の発現あるいは機能を増強することができる化合物には、アトピー性皮膚炎の症状を抑える作用が期待できる。

また、本発明のスクリーニング方法によって選択される化合物は、TR3 または TINUR 活性化とそれに伴う好酸球アポトーシス誘導という全く新しい作用機序を有するアレルギー性疾患治療薬となるものと期待される。従って本発明は、本発明のスクリーニング方法によって得ることができる化合物を有効成分として含有するアレルギー性疾患治療薬を提供する。

なお上記化合物には、本発明のスクリーニング方法を用いて単離しうる化合物の構造の一部を、付加、欠失及び／又は置換により変換される化合物も含まれる。上述のように、脂溶性メディエーターの中から、TR3 または TINUR の転写活性化能を増強する化合物 (TR3 または TINUR のリガンド活性物質) として本発明者らにより、シクロペンテノン構造を有するプロスタグランジンが見出された。従って、本発明のアレルギー性疾患治療薬として、例えば、本発明のスクリーニング方法によって得ることができるシクロペンテノン構造を有するプロスタグランジンを有効成分として含有するアレルギー性疾患治療薬を好適に挙げるることができる。該プロスタグランジンの具体例としては、TR3 についてはプロスタグランジン  $A_2$  (prostaglandin  $A_2$ )、プロスタグランジン  $A_1$  (prostaglandin  $A_1$ )、15-エピ プロスタグランジン  $A_1$  (15-epi prostaglandin  $A_1$ )、15(R)-15-メチル プロスタグランジン  $A_2$  (15(R)-15-methyl prostaglandin  $A_2$ )、16-フェノキシ テトラノール プロスタグランジン  $A_2$  (16-phenoxy tetranor prostaglandin  $A_2$ )、17-フェニル トリノール プロスタグランジン  $A_2$  (17-phenyl trinor prostaglandin  $A_2$ )、15-デオキシ-デルタ 12, 14-プロスタグランジン  $A_1$  (15-deoxy-delta12, 14-prostaglandin  $A_1$ )、15 デオキシ-デルタ 12, 14-プロスタグランジン  $J_2$  (15 deoxy-delta12, 14-prostaglandin  $J_2$ )、8-イソ プロスタグランジン  $A_1$  (8-iso prostaglandin  $A_1$ )、TINUR についてはプロスタグランジン  $A_2$ 、プロスタグランジン  $A_1$ 、15-エピ プロスタグランジン  $A_1$ 、15(R)-15-メチル プロスタグランジン  $A_2$ 、16-フェノキシ テトラノール プロスタグランジン  $A_2$ 、17-フェニル トリノール プロスタグランジン  $A_2$ 、15 デオキシ-デルタ 12, 14-プロスタグランジン  $J_2$ 、8-イソ プロスタグランジン  $A_1$  等を挙げるることができる。

また本発明の TR3 もしくは TINUR 受容体のリガンド活性を有する物質は、好酸球のアポトーシスを誘導し、抗アレルギー作用を有するものと考えられる。従って、本発明は、TR3 もしくは TINUR 受容体のリガンドを有効成分として含有するアポトーシス誘導剤、並びに、TR3 もしくは TINUR 受容体のリガンドを有効成分として含有するアレルギー性疾患治療薬を提供する。本発明のアポトーシス誘導剤は、好ましくは、好酸球のアポトーシス誘導剤である。

TR3 もしくは TINUR 受容体のリガンドとしては、上記のシクロペンテノン構造を有するプロスタグランジン、後述の表 14～49 に掲載の化合物等を挙げるることができる。



また、TR3 または TINUR の合成リガンドは、当業者においてはそれぞれ TR3 または TINUR の立体構造とのドッキングスタディーから容易に推察され合成展開することが可能である。

「ドッキングスタディー」とは通常、受容体の立体構造に基づいた 3D クエリーファーマコファーマモデルにより、数 10 万個の化合物の 3 次元 DBの中から、リガンド結合ドメインにフィットする化合物やコンフォメーションをコンピュータ上で探索することを言う。ドッキングスタディーは、例えば、以下の (1) ~ (4) の手順に従って行われる。

(1) Modeler によるタンパクの 3D 構造の構築 (ホモロジーモデル)

(2) C 2. LigandFit による結合部位の検索

(3) C 2・SBF による結合部位の Pharmacophore クエリ構築

(4) Pharmacophore クエリによる 3D データベースの検索

3D Pharmacophore 検索に関する文献としては、例えば、Pharmacophore Perception, Development, and Use in Drug Design (Iul Biotechnology Series, 2)-US-ISBN:0963681761 (Hardcover) Guner, Osman F. (Edt) /Publisher: Intl Univ Line Published 1999/12 等を挙げることができる。

このような合成リガンドを有効成分として含有する薬剤もまた、本発明のアレルギー性疾患治療薬に含まれる。また、上記合成リガンドは被検候補化合物として、本発明の上記方法に供することにより、真のリガンドであるか否かを評価することも可能である。

また本発明者らは、本発明の TR3 または TINUR 受容体の発現が好酸球内で特異的に誘導されることを初めて見出したことから、該受容体の低分子リガンドの探索を行った。より詳しくは、ファーマコファーマモデルにより、PGA 誘導体の TR3 リガンド結合領域に対する結合位置をシミュレートし、PGA 誘導体のレポーター系における構造活性相関情報から、結合ポケットに適合する PGA 誘導体以外の化合物をデータベースより選択した。従って、本発明の TR3 もしくは TINUR 受容体のリガンドとして、上記のようにして選択された化合物を挙げることができる。より具体的には表 14 ~ 49 に掲載の化合物を示すことができる。これらの化合物は、本発明の受容体に対するアゴニスト抗体よりも、有用であるものと考えられる。

また本発明者らは、好酸球 CD30 リガンド刺激によって、TR3 もしくは TINUR 遺伝子の発現を上昇させることを見出した。本発明は、好酸球 CD30 受容体のリガンドを含む、TR3 もしくは TINUR 遺伝子の発現誘導剤を提供する。該発現誘導剤は、好酸球における TR3 または TINUR の下流遺伝子の発現を制御することによって好酸球のアポトーシスを誘導することを機序とする、アレルギー性疾患治療薬となることが期待される。

本発明のアレルギー性疾患治療薬、アポトーシス誘導剤、および遺伝子発現誘導剤は、生理学的に許容される担体、賦形剤、あるいは希釈剤等と混合することによって製造することも可能である。本発明のアレルギー性疾患の治療剤は、アレルギー症状の改善を目的として、経口、あるいは非経口的に投与することができる。

- 5 経口剤としては、顆粒剤、散剤、錠剤、カプセル剤、溶剤、乳剤、あるいは懸濁剤等の剤型を選択することができる。非経口剤としては、例えば、注射剤、座薬、塗り薬等を挙げることができる。注射剤としては、皮下注射剤、筋肉注射剤、あるいは腹腔内注射剤等を示すことができる。

- 10 投与量は、患者の年齢、性別、体重および症状、治療効果、投与方法、処理時間、あるいは該医薬組成物に含有される活性成分の種類などにより異なるが、通常成人一人あたり、一回につき 0.1 mg から 500 mg の範囲で、好ましくは 0.5 mg から 20 mg の範囲で投与することができる。しかし、投与量は種々の条件により変動するため、上記投与量よりも少ない量で十分な場合もあり、また上記の範囲を超える投与量が必要な場合もある。

- 15 また本発明者らは、TR3 または TINUR 受容体タンパク質の発現が亢進することにより、細胞がアポトーシス誘導することを見出した。従って、細胞において TR3 または TINUR タンパク質を活性化させることにより、アポトーシスを誘導させることが可能である。従って本発明は、細胞における TR3 または TINUR 受容体タンパク質を活性化させることを特徴とする、細胞のアポトーシス誘導方法を提供する。上記方法  
20 には、TR3 または TINUR 遺伝子の発現を活性化させることにより、細胞のアポトーシス誘導を行う方法も含まれる。

- 本方法の好ましい態様においては、本発明のスクリーニング方法によって得ることができる化合物またはシクロペンテノン構造を有するプロスタグランジンと細胞とを接触させることにより、アポトーシスの誘導を行う。本発明の上記方法における細胞  
25 は、好酸球細胞であることが好ましい。アトピー性皮膚炎患者の末梢血好酸球数が減少することが知られている。よって、本発明の方法を利用して好酸球を特異的に細胞死に導くことにより、アレルギー性疾患を治療することが可能と考えられる。即ち、本方法は、新たなアレルギー性疾患の治療方法の開発へ繋がるものと大いに期待される。

- 30 また、本発明のスクリーニング方法によって得ることができる化合物またはシクロペンテノン構造を有するプロスタグランジンは、アポトーシスを誘導する作用があるものと考えられることから、本発明は、これら化合物を含有するアポトーシス誘導剤も提供する。

- 本発明により、アトピー性皮膚炎患者の活性化した好酸球において発現に差の  
35 見られる遺伝子が提供された。本発明の遺伝子の発現を指標にすることにより、アレルギー

一性疾患の検査、および治療薬候補化合物のスクリーニングを行うことが可能となった。

本発明におけるアレルギー性疾患関連遺伝子は、アレルゲンの種類にかかわらず、簡便にその発現レベルを知ることができる。従って、アレルギー反応の病態を総合的に把握することができる。

また本発明のアレルギー性疾患の検査方法は、末梢血好酸球を試料としてその発現レベルを解析することができるので、患者に対する侵襲性が低い。遺伝子解析技術は、年々ハイスループット化、低価格化が進行している。従って本発明によるアレルギー性疾患の検査方法は、近い将来、ベッドサイドにおける重要な診断方法となることが期待される。この意味で本発明の方法の診断的価値は高い。

更に、本発明のスクリーニング方法は、アトピー性皮膚炎の代表的な臨床マーカーである好酸球の増減と密接に関連する遺伝子機能を指標として実施される。従って、このスクリーニング方法によって見出すことができる化合物は、幅広いアレルギーの病態制御に有用であると期待できる。

また本発明により提供されるアレルギー性疾患治療薬は、TR3 または TINUR の活性化とそれに伴う好酸球のアポトーシス誘導という全く新しい作用機序をもった医薬品として有用である。

以下、本発明を実施例により、さらに具体的に説明するが本発明はこれら実施例に制限されるものではない。

#### EXAMPLE 1

アトピー性皮膚炎患者末梢血好酸球における、アフィメトリックス社ジーンチップによるディファレンシャル発現解析

発現変動している新しい治療関連遺伝子あるいは診断に有用な遺伝子を見出すことを目的として、アトピー性皮膚炎患者の種々の病態（軽症、重症ステロイド感受性、重症ステロイド抵抗性）と健常人の末梢血好酸球で発現している遺伝子について、以下のようにして、ジーンチップを用いたディファレンシャルな発現比較解析を行った。

血液を採取した6例のアトピー性皮膚炎患者および2例の健常人のプロファイルを表2に示す。アレルゲン非特異的 (Total IgE)、ダニおよびスギ特異的 IgE は EIA 法により測定した。すなわち、抗ヒト IgE 抗体を結合させたキャップに被検血清を反応させ、血清中のアレルゲン非特異的 IgE 抗体、またはダニ、スギ特異的 IgE 抗体を結合させた。次に、 $\beta$ -D-ガラクトシダーゼ標識抗ヒト IgE 抗体と基質液 (4-メチルウンベルフェリル- $\beta$ -D-ガラクトピラノシド) を加え、反応させて蛍光物質を生成させた。反応停止液を加えて反応を停止させ、同時測定の標準 IgE の蛍光強度より抗体濃度を決定した。LDH の測定は、UV 法 (Wroblewski-La Due 法) により、ビルビン酸と NADH の反応による NADH の減少速度を吸光度の減少から算出した。LDH 値

の測定には、L タイプワコーLDH（和光純薬）と 7170 型自動分析装置（日立）を用いた。好酸球数は、EDTA 添加血液 2ml を試料として鏡検法と自動血球分析装置 SE-9000（RF/DC インピーダンス方式、Sysmex 製造）により測定した。

	健常		AD 軽症 *		AD 重症 (ステロイド感受性 **)		AD 重症 (ステロイド抵抗性**)	
	男	女	男	女	女	男	男	男
性別								
年齢	23	17	30	25	12	16	24	16
全 IgE (U/ml)	45	25	5	380	2,400	15,000	14,000	70,000
cedar IgE	<0.34	<0.34	<0.34	6.12	<0.34	94.8	60.6	>100
mite IgE	<0.34	<0.34	<0.34	18.2	>100	>100	>100	>100
LDH	228	241	211	296	477	465	303	595

表中、\*は全体の表面積における皮膚炎の領域 $\leq 10\%$ 、\*\*は標準的な局所グルココルチコイド治療と比較した際の感受性を表す。

(1) 末梢血好酸球からの DNA チップ用の RNA 採取

患者から採取した全血に 3% デキストラン溶液を加えて 30 分室温放置し、赤血球を沈降させた。上層の白血球画分を回収し、フィコール溶液 (Ficoll-Paque PLUS; アマシャムファルマシアバイオテック) の上に載せて 1500rpm、30 分室温で遠心した。下層に回収された顆粒球画分を CD16 抗体磁気ビーズと 4°C で 30 分反応させ、MACS を用いた分離でトラップさせずに溶出する細胞を好酸球として実験に用いた。

上記のように調製した好酸球を Isogen (日本ジーン; 和光純薬) に溶解し、この溶液から、Isogen に添付されているプロトコルに従って RNA を分離した。クロロホルムを加え、攪拌遠心して水層を回収した。次にイソプロパノールを加え、攪拌遠心して沈殿の全 RNA を回収した。回収した全 RNA は、DNase (日本ジーン; 和光純薬) を加えて 37°C 15 分反応させ、フェノール-クロロホルム抽出してエタノール沈殿で RNA を回収した。これらの RNA を用いた以降のジーンチップによる解析については、アフィメトリックス社のプロトコルに従った。

(2) DNA チップ用の cDNA 合成

全 RNA 2-5  $\mu$ g から、T7-(dT)<sub>24</sub> (Amersham Pharmacia Biotech) をプライマーとして、Affymetrix 社の Expression Analysis Technical Manual の方法に従い Superscript II Reverse Transcriptase (Life Technologies 社) を用いて逆転写し 1 本鎖 cDNA を作製した。T7-(dT)<sub>24</sub> プライマーは、以下のように T7 プロモーターの塩基配列に d(T)<sub>24</sub> を付加した塩基配列からなる。

T7-(dT)<sub>24</sub> プライマー: 5'-GGCCAGTGAATTGTAATACGACTCACTATAGGGAGGCGG-(dT)<sub>24</sub>-3'  
(配列番号: 11)

次に、Expression Analysis Technical Manual に従い、DNA Ligase, DNA polymerase I、および RNase H を加え、2 本鎖 cDNA を合成した。cDNA をフェノール・クロロホルム抽出後、Phase Lock Gels に通し、エタノール沈澱し精製した。

さらに、BioArray High Yield RNA Transcription Labeling Kit を用い、ビオチンラベルした cRNA を合成した。RNeasy Spin column (QIAGEN) を用いて cRNA を精製し、熱処理により断片化した。

そのうち 1~5  $\mu$ g の cRNA を Expression Analysis Technical Manual に従い Hybridization Cocktail に加えた。これをアレイに入れ、45°C で 16 時間ハイブリダイゼーションした。DNA チップとしては GeneChip<sup>®</sup> HG-U95A (Affymetrix 社製) を用いた。GeneChip<sup>®</sup> HG-U95A は、およそ 12,000 種類のヒト cDNA や EST に由来する塩基配列からなるプローブで構成されている。

DNA チップを洗浄した後、Streptavidin Phycoerythrin を加え染色した。洗浄後、normal ヤギ IgG とビオチン化ヤギ抗ストレプトアビジン IgG 抗体の抗体混合液をア

レイに加えた。さらに、蛍光強度を増強する目的で、再度 Streptavidin Phycoerythrin を加え染色した。洗浄後、スキャナーにセットし、DNA チップ解析ソフトにて解析した。

### 5 (3) DNA チップ解析

DNA チップ解析ソフトである Suite を用いて発現蛍光感度を測定し、データ解析を行った。まず全てのチップについて Absolute analysis を行い、用いたサンプル各々の遺伝子発現量を測定した。

10 1 個のチップデータの解析は、プローブセットのパーフェクトマッチとミスマッチの蛍光強度を比較して、positive と negative を決定した。Positive Fraction、Log Avg、Pos/Neg の値から判定される Absolute Call である P(present)、A (absent)、および M (marginal) の 3 区分の判定を行った。用語定義は以下に示した。

Positive Fraction; Positive なペアの割合

15 Log Avg; パーフェクトマッチとミスマッチのプローブセルの蛍光強度比の対数の平均

Pos/Neg; Positive ペア数と Negative ペア数の比

また、パーフェクトマッチとミスマッチのプローブセルの蛍光強度の差の平均値である Average Difference (Avg Diff) も計算した。

20 患者と健常人で 3 倍以上発現変動のあった遺伝子を選別したが、HG-U95A チップ遺伝子約 12,000 個の中から TR3 が選ばれてきた。健常を含めて各群 2 例の好酸球 RNA をジーンチップにかけるので、各症例間 2 x 2 で 4 通りの発現比較ができる。TR3 は、健常と重症 (ステロイド感受性) 間の 4 つすべての組合せにおける発現比較で、いずれも 3 倍以上の変動 (重症で亢進) という結果が得られた (表 3)。

25 表 3

Experiment Name	Probe Set	Accession No.	Annotation	Avg Diff	Abs Call	Diff Call	Avg Diff Change	Fold B=A Change	
C4E307-315	280_g_at	L13740	TR3 orphan receptor	1316	P	I	1208 *	~3.7	4(41)
C4E307-340	280_g_at			1234	P	I	1259 *	~3.9	
C4E309-315	280_g_at			2042	P	I	1758 *	~4.9	
C4E309-340	280_g_at			1913	P	I	1956 *	~5.5	

30 ABI7700 に用いたプライマーおよび TaqMan プローブは、スイートより得られる accession No をもとに N C B I の配列情報から Primer Express (PE バイオシステムズ) により設計した。TaqMan プローブの 5' 末端は FAM(6-carboxy-fluorescein)で、また 3' 末端は TAMRA(6-carboxy-N,N,N',N'-tetramethylrhodamine)で標識されている。TaqMan 法に使用したプライマーおよびプローブは次の通りである。

Primer1(5') : CCACTTTGGGAAGGAAGATGCT (配列番号 : 5)

Primer2(3') : ACTTTCGGATGACCTCCAGAGA (配列番号 : 6)

TaqMan probe : ATGTACAGCAGTTCTACGACCTGCTCTCCG (配列番号 : 7)

5 鋳型には全 RNA からポリ T(12~18mer)をプライマーとして逆転写した cDNA を用いた。コピー数を算出する標準曲線のために両プライマーで増幅される塩基配列領域を含むプラスミドクローンを各々の遺伝子について準備し、その段階希釈を鋳型として反応を行った。PCR 増幅のモニタリングのための反応液の組成は表 4 に示した。

表 4

ABI-PRISM 7700 の反応組成 (1 ウェルあたりの反応量)

10	滅菌蒸留水	25.66 ( $\mu$ L)
	10x TaqMan バッファーA	5
	25mM MgCl <sub>2</sub>	7
	dATP(10mM)	1.2
15	dCTP(10mM)	1.2
	dGTP(10mM)	1.2
	dUTP(10mM)	1.2
	Forward Primer (100 $\mu$ M)	0.15
	Reverse Primer (100 $\mu$ M)	0.15
20	TaqMan プローブ(6.7 $\mu$ M)	1.49
	AmpliTaq Gold (5U/ $\mu$ L)	0.25
	AmpErase UNG (1U/ $\mu$ L)	0.5
	テンプレート溶液	5
25	総量	50

30 また、試料中の cDNA 濃度の差を補正するため、補正用内部標準として  $\beta$ -アクチン( $\beta$ -actin)遺伝子について同様の定量解析を行い、それら遺伝子のコピー数を基に補正して、目的遺伝子のコピー数を算出した。 $\beta$ -アクチン( $\beta$ -actin)遺伝子の定量には、ヒト cDNA を鋳型として用いた。

$\beta$  アクチン測定用のプライマーとプローブは、TaqMan  $\beta$ -actin Control Reagents (PE バイオシステムズ) に添付のものを用いて行った。塩基配列は以下の通りである。 $\beta$  アクチンにより補正した。

35 ・  $\beta$  アクチンフォワードプライマー

TCA CCC ACA CTG TGC CCA TCT ACG A (配列番号 : 12)



・  $\beta$  アクチンリバープライマー

CAG CGG AAC CGC TCA TTG CCA ATG G (配列番号 : 1 3)

・  $\beta$  アクチン TaqMan プローブ

5'-(FAM)ATGCCC-T(TAMRA)-CCCCCATGCCATCCTGCGTp-3' (配列番号 : 1 4)

5 FAM:6-carboxy-fluorescein

TAMRA:6-carboxy-N, N, N', N'-tetramethylrhodamine

    ジーンチップでの発現解析は遺伝子スクリーニングを主眼とし、各群 2 例しかない  
    ので、例数が一群 1 0 例以上まとまった大きな患者末梢血好酸球パネル (表 5) にお  
    いて、ABI7700 で健常人と患者の発現比較を行い、スクリーニングの信頼性をチェッ

10 クした。

表 5

	No.	サンプル ID	ドナーID	トランスファー ID	性 別	年 齢	Toal IgE	抗ダニ IgE	抗スギ IgE	LDH	好酸 球(%)	好酸球 (mm3)
健康人	1	BL10138	V-00026	10138	F	26	5	<0.34	<0.34	105	0	80
	2	BL10140	V-00015	10140	M	52	81	0.71	<0.34	78	2	150
	3	BL10141	V-00040	10141	F	32	59	0.37	<0.34	326	0	40
	4	BL10142	V-00032	10142	F	35	83	14.6	11.2	187	3	250
	5	BL10143	V-00029	10143	F	45	29	<0.34	1.75	113	2	90
	6	BL10144	V-00027	10144	F	29	17	<0.34	1.51	74	2	90
	7	BL10145	V-00034	10145	F	26	120	<0.34	17.1	272	3	590
	8	BL10146	V-00030	10146	F	30	560	<0.34	63.2	251	1	120
	9	BL10147	V-00001	10147	M	50	44	<0.34	17.9	265	4	130
	10	BL10148	V-00003	10148	M	43	220	4	3.54	242	5	250
	11	BL10149	V-00028	10149	M	32	110	1	9.84	245	3	180
	12	BL10150	V-00035	10150	M	63	86	<0.34	12.6	209	5	300
	13	BL10151	V-00019	10151	M	48	42	<0.34	14	300	1	180
軽症	14	BL00058	PA00079	9707311	M	0	581				9.7	1390
	15	BL00068	PA00084	9708072	F	13	1687				6.8	365
	16	BL00112	PA00112	9712051	M	2	519				2.2	151
	17	BL00123	PA00120	9712252	F	10	799				12.9	1050
	18	BL00133	PA00129	9712266	M	12	274				1.6	122
	19	BL00198	PA00023	9807213	M	21	9630				15.1	1080
	20	BL00207	PA00181	9807273	F	6	668				8	635
	21	BL00217	PA00190	9808033	M	5	777				22.3	1790
	22	BL00221	PA00042	9808061	F	8	1494				6.6	378
	23	BL00234	PA00029	9808311	F	5	702				6.6	510
	24	BL00252	PA00176	9901071	M	14	2096				7.2	333
	25	BL00259	PA00162	9902161	M	20	2622				13.3	846
	26	BL00270	PA00213	9903292	M	15	230				7.5	368
	27	BL00317	PA00240	0003282	F	14	106	3.77	24.7		2.8	154
	28	BL00327	PA00136	0004033	M	8	1178	<0.35	<0.35		4.4	396
中等症	29	BL00095	PA00099	9710031	M	3	159				2.5	190
	30	BL00128	PA00124	9712261	M	12	7158				5.2	361
	31	BL00145	PA00048	9802192	F	9	2349				5.1	193
	32	BL00268	PA00179	9903261	M	9	512				9.5	906
	33	BL00278	PA00217	9904061	M	15	1082				22.1	1110
	34	BL00328	PA00175	0004041	M	7	4775	>100	93.3		7.1	638
	35	BL00089	PA00098	9709092	M	7	359				13.3	638
	36	BL00110	PA00110	9711281	F	3	11.5				6.1	198
	37	BL00122	PA00119	9712251	F	12	528				9.7	643
	38	BL00139	PA00025	9801082	M	18	22614				13.7	1140
	39	BL00156	PA00143	9803264	M	6	2625				5	551
	40	BL00287	PA00221	9906231	M	15	1149				3.7	601
	41	BL00296	PA00059	9908201	M	5	1639				6.8	477
	42	BL00323	PA00244	0003302	M	6	4532	>100	69.1		11	909
	43	BL00335	PA00259	BL18526369	F	14	1581	>100	5.46		15.9	1820
重症	44	BL00078	PA00090	9708251	F	3	135				3.8	254
	45	BL00084	PA00067	9709021	M	3	2149				9.8	1000
	46	BL00163	PA00148	9803304	M	11	137				3.5	274
	47	BL00168	PA00152	9804033	F	19	2732				5.2	261
	48	BL00180	PA00163	9805151	M	17	14758				13.6	1010
	49	BL00242	PA00001	9810061	M	19	13747				13	1230
	50	BL00243	PA00200	9810221	F	6	10967				5.9	662
	51	BL00247	PA00071	9812211	M	16	11610				13.4	972
	52	BL00260	PA00209	9902162	M	0	136				2.5	277
	53	BL00262	PA00120	9902181	F	10	120				3	109
	54	BL00150	PA00137	9803161	F	8	371				4.9	375
	55	BL00257	PA00208	9902053	M	11	268				7.6	468
	56	BL00293	PA00227	9907221	F	10	18301				13.8	1750
	57	BL00298	PA00229	9909141	M	11	9591	>100	18.2		11.9	940
	58	BL00314	PA00238	0002151	M	19	23726	>100	30		6	376
	59	BL00318	PA00241	0003283	F	7	131	<0.35	<0.35		5.7	330
	60	BL00321	PA00243	0003286	F	4	232	<0.35	<0.35		9.1	856
	61	BL00337	PA00261	0005191	F	29	474	52.5	31.6		12.3	797

末梢血好酸球における TR3 の発現は、健常に比してアトピー性皮膚炎患者で、症例の強弱にはあまりかかわりなく多重比較で有意に亢進することが確認された（表 6、図 1）。

CIE-2 L13740	Blood	beta-actin(raw) copy/ ng	L13740(raw)		beta補正用 raw(/ng)/平均	L13740補正 raw/beta 補正
			copy/ 5ng	copy/ 1ng		
健常人13	1	253126	1119	224	1.01130301	221
	2	541166	5637	1127	2.16209434	521
	3	214239	2454	491	0.855938946	573
	4	369621	5176	1035	1.476729393	701
	5	716536	6324	1265	2.862741935	442
	6	169173	6969	1394	0.675887508	2062
	7	601310	11426	2285	2.40238633	951
	8	213062	2097	419	0.851236036	493
	9	371589	1266	253	1.484591854	171
	10	646297	1955	391	2.582119848	151
	11	208737	2183	437	0.833956352	524
	12	212114	13130	2626	0.84744903	3099
	13	379539	1205	241	1.516355526	159
軽症15	14	508758	4893	979	2.032618527	481
	15	248937	6962	1392	0.994564691	1400
	16	221813	12928	2586	0.886198604	2918
	17	315168	11862	2372	1.259174796	1884
	18	141827	11906	2381	0.566636769	4202
	19	244028	17542	3508	0.974953584	3598
	20	348051	14940	2988	1.390552351	2149
	21	387693	20063	4013	1.548931234	2591
	22	268468	4232	846	1.072599907	789
	23	206673	5843	1169	0.825709955	1415
	24	136652	10968	2194	0.545959033	4018
	25	218963	4619	924	0.874812329	1056
	26	209273	3879	776	0.836097009	928
	27	131977	3296	659	0.52728236	1250
	28	121064	22191	4438	0.483680797	9176
中症寛解期6	29	165901		0	0.662815331	0
	30	134119	12595	2519	0.535841346	4701
	31	86340	4693	939	0.344949082	2721
	32	472440	3797	759	1.887519071	402
	33	170914	24513	4903	0.682845244	7180
	34	367818	1497	299	1.469525949	204
中症増悪期9	35	162258	23698	4740	0.648261218	7311
	36	90969		0	0.363443211	0
	37	246460	24652	4930	0.984671042	5007
	38	146805	12808	2562	0.586522301	4367
	39	179179	10603	2121	0.715863818	2962
	40	138858	4884	977	0.554771366	1761
	41	133317	5210	1042	0.532635051	1956
	42	171308	52561	10512	0.684419966	15359
	43	285295	904	181	1.139827753	159
	44	154902	4994	999	0.618872876	1614
重症寛解期10	45	78948	12992	2598	0.315418709	8238
	46	231612	4595	919	0.925346905	993
	47	155564	7337	1467	0.621516584	2361
	48	385848	1428	286	1.541561787	185
	49	264744	437	87	1.05772078	83
	50	144715	35283	7057	0.578174465	12205
	51	205943	7545	1509	0.822795017	1834
	52	155395	5335	1067	0.62084169	1719
	53	151703	21933	4387	0.606092505	7238
	54	397821	2000	400	1.589395971	252
重症増悪期8	55	446400	5057	1011	1.783480045	567
	56	280724	895	179	1.121564845	160
	57	161385	6500	1300	0.644775207	2016
	58	134978	11103	2221	0.539271624	4118
	59	24740	19712	3942	0.0988414	39885
	60	241793	37484	7497	0.966023991	7760
	61	93068	21520	4304	0.371831799	11575
	total	15268113				

#### (4) 統計解析

- 上記のデータを利用して、パラメトリック多重比較検定、およびノンパラメトリック多重比較検定を行った。統計解析は、The SAS SYSTEM の SAS 前臨床パッケージ Ver 4.0 (SAS Institute Inc.)を用いて行った。結果を表7に示す。健全と軽症、健全と中等症、健全と重症の間の多重比較において、いずれも有意に患者群で高かった。

表 7

		C4E HG-U95A 統計解析結果(Bactin補正)							
遺伝子名		パラメトリック多重比較				ノンパラメトリック多重比較			
		Dunnett	p値	Tukey	p値	Dunnett	p値	Tukey	p値
L13740	TR3 orphan receptor	AS > Nm	0.0533			AL > Nm	0.0339	AM > Nm	0.0189
						AM > Nm	0.01	AS > Nm	0.0378
						AS > Nm	0.0204		

- 10 (Nm=健常人、AL=アトピー性皮膚炎軽症、AM=アトピー性皮膚炎中等症、AS=アトピー性皮膚炎重症)

アトピー性皮膚炎病態の末梢血好酸球で、このようなアポトーティックな性格の遺伝子が亢進しているのは、病態に伴って末梢血で増加する好酸球を減少させなければならないというネガティブなフィードバック制御が働くためと考えられる。

15

#### EXAMPLE 2

##### TR3 受容体リガンドの探索

- 好酸球を特異的に細胞死に導く経路を、TR3 の機能の増強を通じて促進することは、喘息のみでなく、本発明者らが調べたアトピー性皮膚炎も含めた種々のアレルギー疾患の治療に繋がる可能性が高い。TR3 は構造上核内受容体であるが、オーファン受容体であり生体内リガンドや活性化物質はまだわかっていない。もしもそれらが見出されれば、好酸球細胞内でダイレクトに TR3 を活性化しアポトーシスを促進させることができる。従って、リガンド活性化物質は抗アレルギー薬としての可能性が高いと考え、リガンドスクリーニングのためのハイスループット系を構築した。

- 25 Mammalian Two Hybrid のシステムを若干改変し、図2のように、pBIND の中に TR3 のリガンド結合領域配列または全長遺伝子 (図3) を挿入し、TR3 と GAL4 の DNA 結合領域が in frame で融合したタンパク質が発現されるようにした。TR3 のリガンド結合領域配列を pBIND に挿入したプラスミドと GAL4 結合サイトをもったルシフェラーゼレポータープラスミドを NIH3T3 細胞にコトランスフェクションし、ルシフェラーゼ活性を自動測定するが、このときさらに、TR3 と会合してヘテロダイマーを形成する転写因子である retinoic acid X receptor (RXR)  $\alpha$  遺伝子を一緒に加えて活
- 30

性を測定することも試みた。この系にさらに低分子物質を加えて、転写増強活性でスクリーニングを行うことができる。

- 5 TR3 は、アトピー性皮膚炎末梢血のように、活性化した好酸球で発現が増強する。生体内に存在するリガンドは、核内受容体が高発現している場所に存在する可能性がある。そこで、このような条件で産生され则认为られる低分子の脂溶性メディエーターをアッセイ系に加え、ルシフェラーゼ活性の増強作用で評価した。脂溶性メディエーターの中から、prostaglandin A<sub>2</sub>, prostaglandin A<sub>1</sub>, 15-epi prostaglandin A<sub>1</sub>, 13,14-dihydro-15-keto prostaglandin A<sub>2</sub>, 15(R)-15-methyl prostaglandin A<sub>2</sub>, delta12- prostaglandin J2 等のシクロペンテノン構造をもったプロスタグラン
- 10 ジンに、T R 3 の転写活性化能を増強させる作用があることを見出した（図4、表8～12）。このように本発明者らの確立した方法によって、ハイスループットでTR3の生体内リガンド及び合成リガンドを発見する道が開かれたとともに、prostaglandin A<sub>2</sub>, prostaglandin A<sub>1</sub> 等の化合物およびその近辺の代謝物が、TR3 の真の生体内リガンドとしての可能性が高いことが明らかになった。

表 8

化合物名	構造式	Nur77 LBD- リガンド活性		Nur77 全長- リガンド活性		Nur1 LBD- リガンド活性		Nur1 全長- リガンド活性	
		RXR(+)	RXR(-)	RXR(+)	RXR(-)	RXR(+)	RXR(-)	RXR(+)	RXR(-)
Prostaglandin A <sub>2</sub>		○ 10 μM	×	○ 10 μM	○ 10 μM	○ 10 μM	×	○ 10 μM	○ 10 μM
Prostaglandin A <sub>1</sub>		○ 10 μM	×	○ 10 μM	○ 10 μM	○ 10 μM	×	○ 10 μM	○ 10 μM
16,16-dimethyl Pr staglandin A <sub>2</sub>		×	×	×	×	×	×	×	×

表 9

Pr staglandin A <sub>3</sub>		x	x	x	x	x	x	x	x
Prostaglandin A <sub>1</sub> ethyl ester		x	x	x	x	x	x	x	x
15-epi Prostaglandin A <sub>1</sub>		x	x	x	x	x	x	x	x
16,16-dimethyl Prostaglandin A <sub>1</sub>		x	x	x	x	x	x	x	x



表 10

[illegible]

表 1 1

[illegible]

表 1 2

[illegible]

EXAMPLE 3

TINUR 遺伝子の発現解析

核内オーファン受容体サブファミリーの  $\beta$  タイプである TINUR については、臨床末梢血サンプルを用いた DD やジーンチップによる発現比較解析からは選ばれてこなかった。この受容体についても、アレルギー疾患をはじめとする特定疾患との関連性は明らかになっていない。しかしながら、TR3 との機能的な類似性が予測されるので、TR3 と同様に例数が一群 10 例以上まとまった同じ患者末梢血好酸球パネル（表 5）において、ABI7700 で健常人と患者の発現比較を行った。TaqMan 法に使用したプライマーおよびプローブは次の通りである。

- 10     Primer1(5') : AGCACAGGCTACGACGTCAA (配列番号 : 8)  
         Primer2(3') : TCTTCTACCTTAATGGAGGACTGC (配列番号 : 9)  
         TaqMan probe : TTGTACCAAATGCCCCTGTCCGGA (配列番号 : 10)

表 13、図 5 に示すように、健常に比してアトピー性皮膚炎患者で、症例の強弱にはあまりかわりなく有意に亢進することが確認された。

表 1 3

C1E-2 TINUR	Blood	beta-actin(raw) copy/ ng	TINUR(raw)		beta補正用 raw(/ng)/平均	TINUR補正 raw/beta補正
			copy/ 5 ng	copy/ 1 ng		
健康人13	1	253126		0	1.01130301	0
	2	541166	81382	16276	2.16209434	7528
	3	214239		0	0.855938946	0
	4	369621	136368	27274	1.476729393	18469
	5	116536		0	2.862741935	0
	6	189173		0	0.675887508	0
	7	601310	203504	40701	2.40238633	16942
	8	213062	78318	15664	0.851236036	18401
	9	371589	121882	24376	1.484591854	16420
	10	646297	105612	21122	2.582119848	8180
	11	208737	165619	33124	0.833956352	39719
	12	212114		0	0.84744903	0
	13	379539	112142	22428	1.516355526	14791
軽症15	14	508758	146688	29338	2.032618527	14433
	15	248937		0	0.994564691	0
	16	221813	414582	82916	0.886198604	93564
	17	315168	275505	55101	1.259174796	43760
	18	141827	279290	55858	0.566636769	98578
	19	244028	246709	49342	0.974953584	50609
	20	348051	332180	66436	1.390552351	47777
	21	387693	119505	23901	1.548931234	15431
	22	268468	144812	28962	1.072599907	27002
	23	206673	216900	43380	0.825709955	52537
	24	136652	228928	45786	0.545959033	83863
	25	218963	135292	27058	0.874812329	30930
	26	209273	198420	39684	0.836097009	47463
	27	131977		0	0.52728236	0
中症 寛解期6	28	121064	115898	23180	0.483680797	47923
	29	165901		0	0.662815331	0
	30	134119	273684	54737	0.535841346	102151
	31	86340		0	0.344949082	0
	32	472440	259151	51830	1.887519071	27459
	33	170914	151666	30333	0.682845244	44422
	34	367818	71428	14286	1.469525949	9721
	35	162258	519205	103841	0.648261218	160184
	36	90969		0	0.369443211	0
	37	246460	338300	67660	0.984671042	68713
	38	146805	221751	44350	0.586522301	75616
	39	179179	240130	48026	0.715863818	67088
	40	138858	107895	21579	0.554771366	38897
中症 増悪期9	41	133317	163876	32775	0.532635051	61534
	42	171308	333904	66781	0.684419966	97573
	43	285295	38321	7664	1.139827753	6724
	44	154902	121579	24316	0.618872876	39290
	45	78948	162181	32436	0.315418709	102835
	46	231612	402817	80563	0.925346905	87063
	47	155564	149795	29959	0.621516584	48203
	48	385848	148392	29678	1.541561787	19252
	49	264744	56146	11229	1.05772078	10616
	50	144715	194006	38801	0.578174465	67110
	51	205943	249286	49857	0.822795017	60595
	52	155395	157681	31536	0.62084169	50796
	53	151703		0	0.606092505	0
重症 増悪期8	54	397821		0	1.589395971	0
	55	446400	263974	52795	1.783480045	29602
	56	280724	54818	10964	1.121564845	9775
	57	161385	102355	20471	0.644775207	31749
	58	134978	85303	17061	0.539271624	31637
	59	24740	44743	8949	0.0988414	90534
	60	241793	322099	64420	0.966023991	66686
	61	93068	135613	27123	0.371831799	72943
total		15268113				
Av.		250297				

EXAMPLE 4

TINUR 受容体リガンドの探索

TINUR も TR3 と同様に核内オーファン受容体であり生体内リガンドや活性化物質はまだわかっていない。もしもそれらが見出されれば、好酸球細胞内でダイレクトに TINUR を活性化しアポトーシスを促進させることができると考えられる。従って、リガンド活性物質は抗アレルギー薬としての可能性が高いと考え、TR3 と同じ手法でリガンドスクリーニングのためのハイスループット系を構築した。

図 2 のように、pBIND の中に TINUR のリガンド結合領域配列または全長遺伝子 (図 3) を挿入し、TINUR と GAL4 の DNA 結合領域が in frame で融合したタンパク質が発現されるようにした。TINUR のリガンド結合領域配列を pBIND に挿入したプラスミドと GAL4 結合サイトをもったルシフェラーゼレポータープラスミドを NIH3T3 細胞にコトランスフェクションし、ルシフェラーゼ活性を自動測定するが、このときさらに、TINUR と会合してヘテロダイマーを形成する転写因子である retinoic acid X receptor (RXR)  $\alpha$  遺伝子と一緒に加えて活性を測定することも試みた。この系にさらに低分子物質を加えて、転写増強活性でスクリーニングを行うことができる。

TINUR も TR3 と同じように、活性化した好酸球で発現が増強する。生体内に存在するリガンドは、核内受容体が高発現している場所に存在する可能性がある。TR3 の生体内リガンドが prostaglandin  $A_2$ 、prostaglandin  $A_1$  であることがわかった。核内受容体サブファミリーのリガンドには構造的な冗長性があるはずである。そこで、TR3 の活性化化合物と同様の誘導体を加え、転写活性の亢進を調べた。TINUR についてはプロスタグランジン  $A_2$ 、プロスタグランジン  $A_1$ 、15-エピ プロスタグランジン  $A_1$ 、15(R)-15-メチル プロスタグランジン  $A_2$ 、16-フェノキシ テトラノール プロスタグランジン  $A_2$ 、17-フェニル トリノール プロスタグランジン  $A_2$ 、15 デオキシ-デルタ 12, 14-プロスタグランジン  $J_2$ 、8-イソ プロスタグランジン  $A_1$  等のシクロペンテノン構造をもったプロスタグランジンに、転写を活性化させる作用があることを見出した (図 6 および表 8 ~ 12)。TINUR (Nurr1) については、Wang らによる X 線結晶解析の結果からリガンドポケットは閉じていて、ナチュラルリガンドのない核内受容体である可能性が示唆されていた (Z. Wang, G. Benoit, J. Liu, S. Prasad, P. Aarnisalo, X. Liu, H. Xu, N. P.C. Walker, T. Perlmann, Structure and function of Nurr1 identifies a class of ligand-independent nuclear receptors (Tularik Inc.); NATURE 423, 29 May, p555-560 (2003))。しかしながら、本発明者らによって、上記の反応は再現性があること、prostaglandin  $A_2$  周辺化合物に構造活性相関があることから、prostaglandin  $A_2$ 、prostaglandin  $A_1$  等の化合物およびその近辺の代謝物は、TR3 のみならず TINUR の生体内リガンドとしての可能性が高いことが今回明らかになった。

EXAMPLE 5

バーチャル化合物

ファーマコフォアモデルにより、PGA誘導体のTR3リガンド結合ドメイン(LBS)領域に対する結合位置をシミュレートし(図7)、PGA誘導体のレポーター系における構造活性相関情報から、結合ポケットに同様にはまるPGA誘導体以外の化合物をカタリストDBにより選択した(BioByte Master File 2001 39,383化合物、2,198,646 confsよりスクリーニング)。

シミュレーションの結果、強く結合する化合物として選ばれてきた158化合物のリスト(含む構造式)を表14~45、次に選ばれてきた117化合物のリストを表46~49に示す。

表 1 4

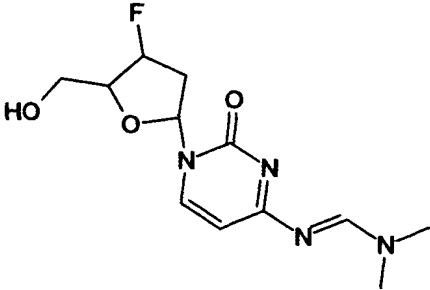
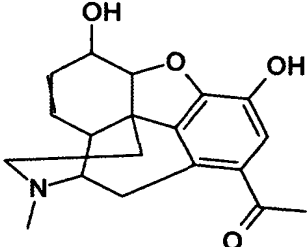
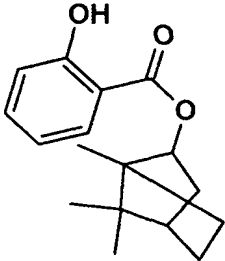
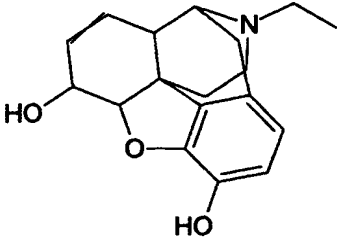
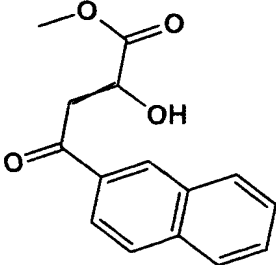
化学	LUDI スコア	HB_ スコア	LPO_ スコア
 <p>2DEOXY3FLUORO CYTIDINEN4DIMET HYLAMINOMETHY LENE</p>	204	0	325
 <p>1ACETOMORPHIN E</p>	158	0	254
 <p>BORNYLSALICYL ATE</p>	151	0	272
 <p>NETHYLMORPHIN E</p>	136	0	257
 <p>2HYDROXY42NAP HTHALENYL4OXO 2BUTENOICACIDM ETHYLESTER</p>	126	0	222



表 1 5

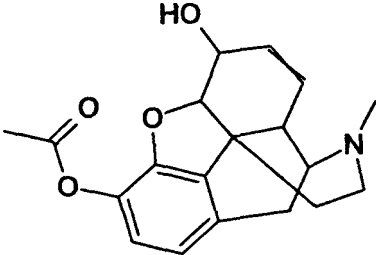
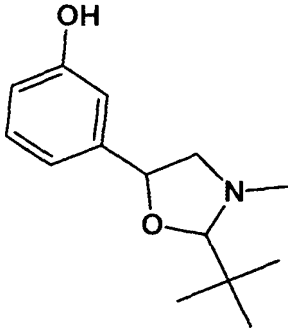
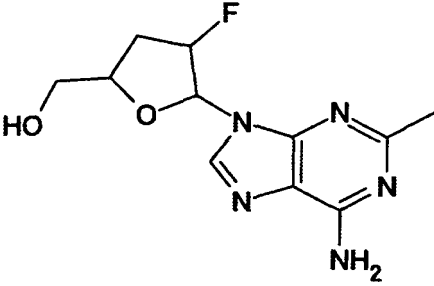
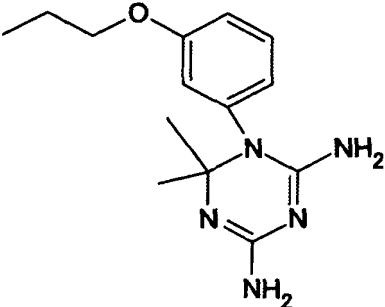
	3ACETYLMORPHINE	123	0	219
	BEREFRINE	112	0	233
	DIDEOXYARAA2METHYL2FLUOROTHIAZINE	112	83	150
	STRIAZINE46DIAMINO12H222DIMETHYL13PROPOXYPHENYL	108	0	254

表 1 6

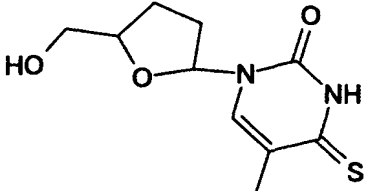
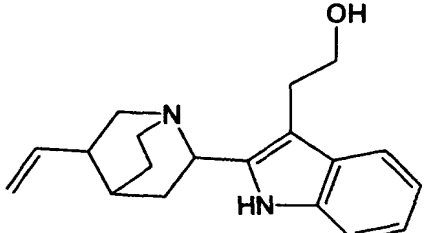
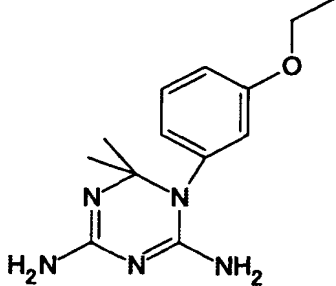
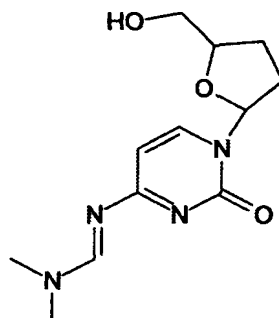
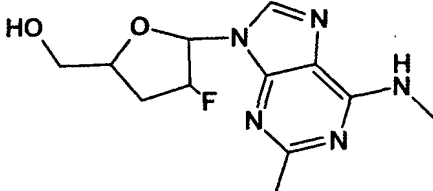
	DIDEOXYTHIATHYMIDINE	107	83	145
	CINCHONAMINE	103	0	275
	STRIAZINE46DIAMINO12DIHYDRO22DIMETHYL13ETHOXYPHENYL	103	0	224
	23DIDEOXYCYTIDINE5'OMETHYLMETHYLENE	101	0	222
	DIDEOXYARABINO2NUCLEOSIDE5'OF2FLUOROETHYLMETHYLENE	101	0	222

表 1 7

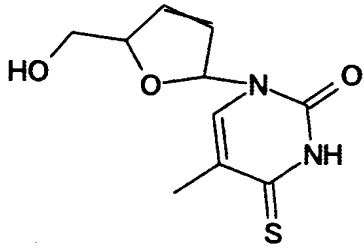
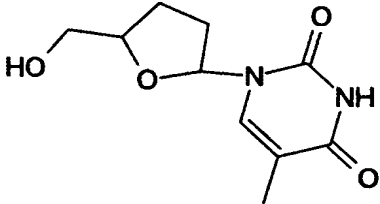
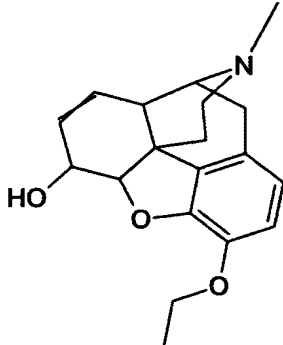
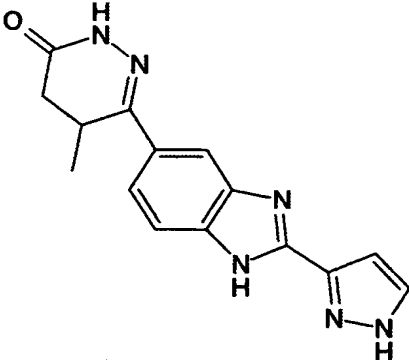
	DIDEOXYTHIATHY MIDINE23DEHYDR O	101	72	150
	DIDEOXYTHYMIDI NE	101	83	139
	ETHYLMORPHINE	101	0	222
	MERIBENDAN	96	0	192

表 1 8

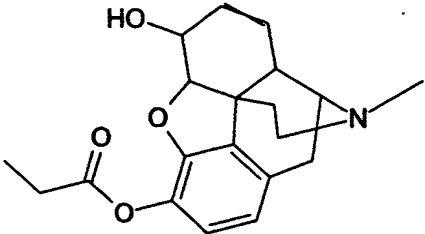
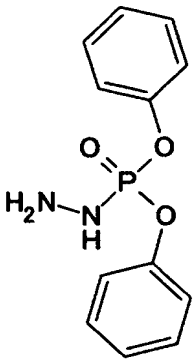
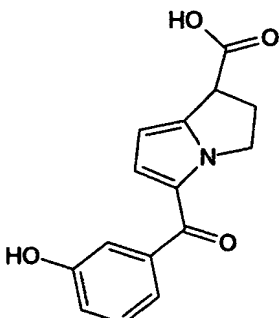
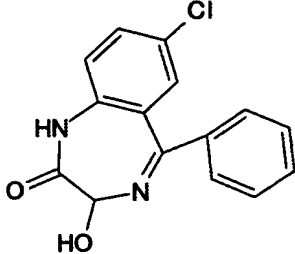
 <p>MORPHINE3PROPI ONYL</p>	95	0	216
 <p>PHOSPHOROHYD RAZIDICACIDDIPH ENYLESTER</p>	93	0	189
 <p>53HYDROXYBENZ OYLH2PYRROLOP YRROLE1CARBOX YLICACID</p>	92	0	213
 <p>OXAZEPAM</p>	90	0	236

表 1 9

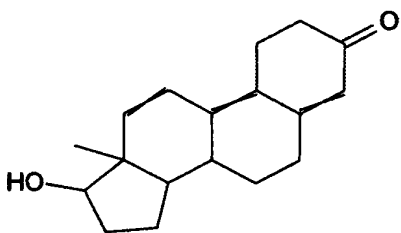
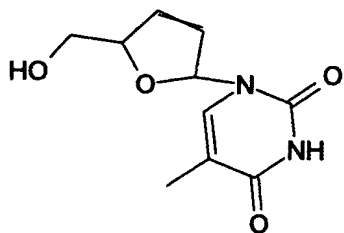
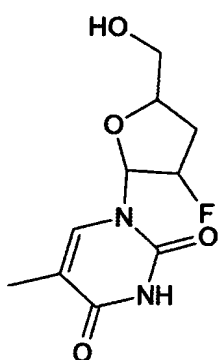
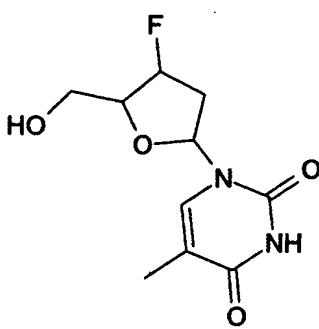
	TRENBOLONE	90	0	186
	STAVUDINE	89	74	136
	THYMINE123DIDE OXY2FLUOROPEN TOFURANOSYL	89	83	127
	ALOVUDINE	87	63	145

表 2 0

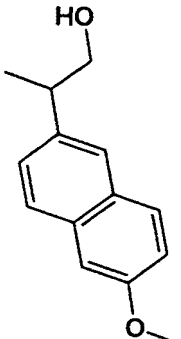
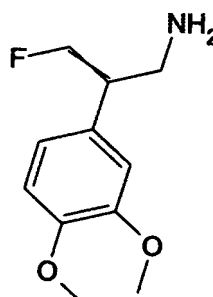
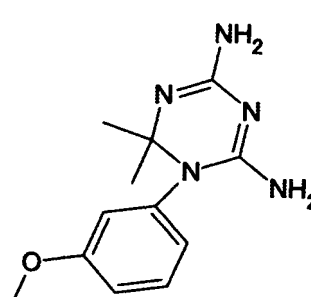
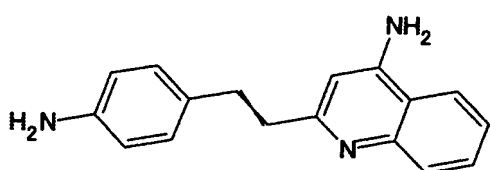
	NAPROXOL	87	0	233
	MDL72638	86	0	207
	12DIHYDROTRIAZINE 46DIAMINO22DI METHYL13METHOXY PHENYL	84	0	180
	4QUINOLINAMINE 2PAMINOSTYRYL	84	0	180

表 2 1

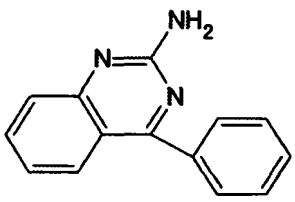
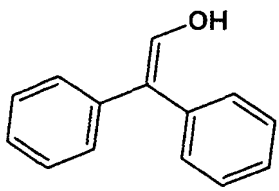
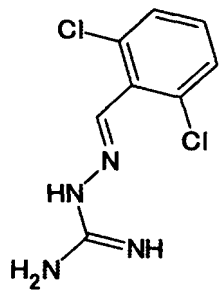
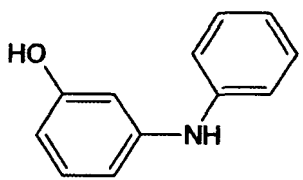
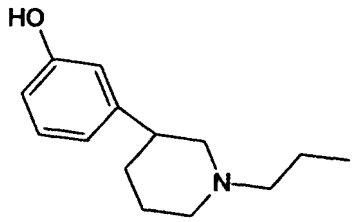
	2AMINO4PHENYL QUINAZOLINE	81	0	177
	DIPHENYLACETAL DEHYDEENOL	81	0	177
	GUANABENZ	81	0	177
	MHYDROXYDIPHE NYLAMINE	81	0	177
	PRECLAMOL	81	0	227

表 2 2

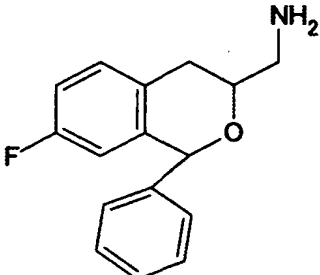
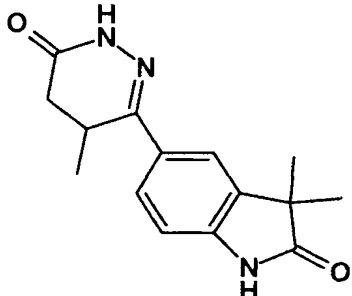
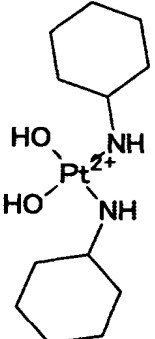
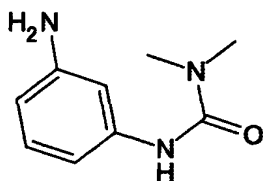
	FENISOREX	77	0	198
	LY195115	75	0	171
	PLATINUMBISCYCLOHEXYLAMMONIUM DIACQUADINITRATE	75	0	171
	11DIMETHYL33AMINOPHENYLUREA	72	0	168



表 2 3

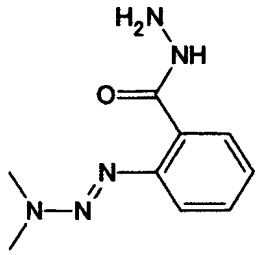
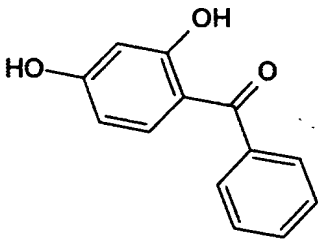
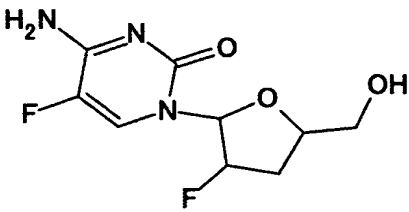
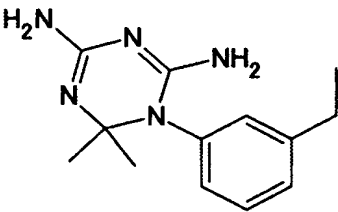
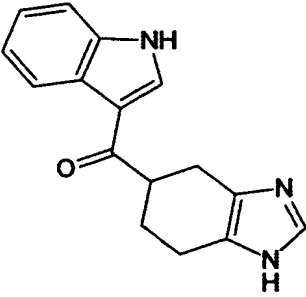
	BENZOICACIDHYD RAZIDEO33DIMET RIAZINO	72	0	168
	BENZOPHENONE2 4DIHYDROXY	72	0	168
	5FLUOROCYTOSI NE123DIDEOXY2F LUOROPENTOFUR ANOSYL	71	0	192
	STRIAZINE46DIAM INO12DIHYDRO22 DIMETHYL13ETHY LPHENYL	71	0	192
	YM060	71	0	192

表 2 4

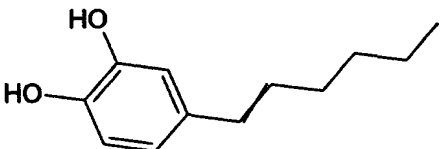
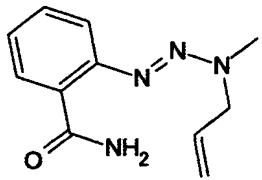
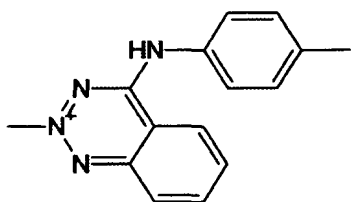
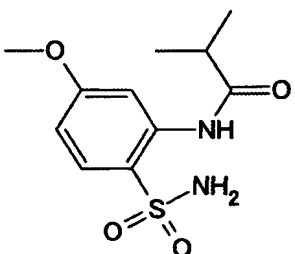
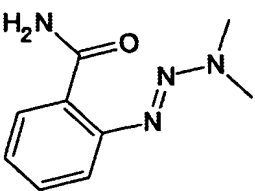
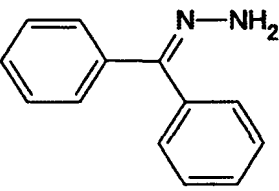
	12DIHYDROXYBENZENE4HEXEN1YL	70	0	242
	BENZAMIDE23METHYL3ALLYL1,2,4-TRIAZIN-5-YL	70	0	216
	2METHYL4PTOLYLAMINO1,2,3-BENZOTRIAZINIUMIODIDE	69	0	165
	BENZENESULFONAMIDE2IBUTYROYLAMINO4METHOXY	67	0	213
	2,3DIMETHYL1-TRIAZINOBENZAMIDE	66	0	162
	BENZOPHENONEHYDRAZONE	66	0	162

表 2 5

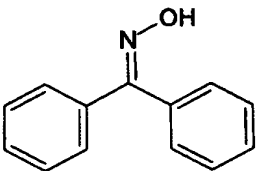
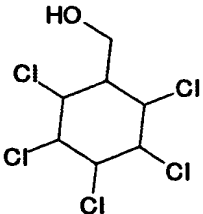
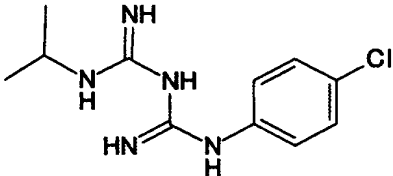
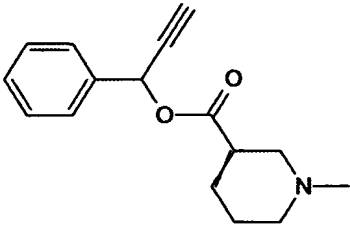
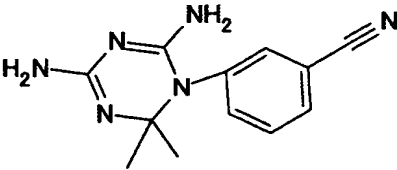
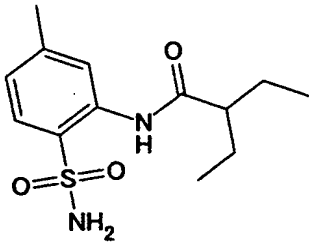
	BENZOPHENONE OXIME	66	0	162
	1HYDROXYMETHY LPENTACHLOROC YCLOHEXANE	65	0	186
	CHLOROGUANIDE	65	0	186
	ARECAIDINEALPH APHENYLPROPAR GYLESTER	64	0	236
	46DIAM22DIME13C YANOPHSTRIAZIN E	63	0	159
	BENZENESULFON AMIDE22ETHYLB TANOYLAMINO4M ETHYL	63	0	260

表 2 6

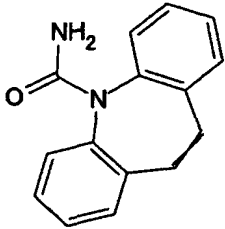
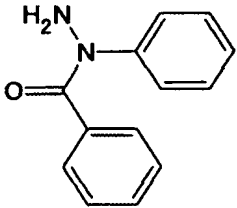
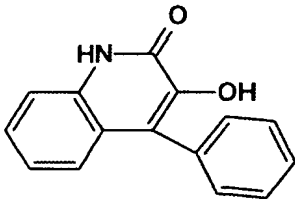
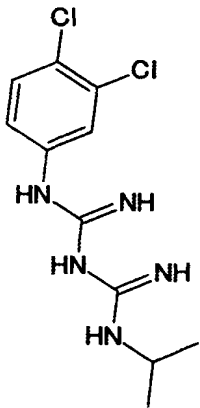
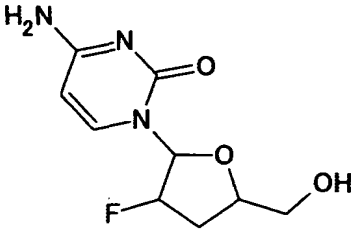
	CARBAMAZEPINE	63	0	159
	N1PHENYLN1BEN ZOYLHYDRAZINE	63	0	159
	VIRIDICATIN	63	0	159
	CHLORPROGUANI L	62	0	183
	DIDEOXYCYTIDIN E2ALPHAFLUORO	62	0	183

表 2 7

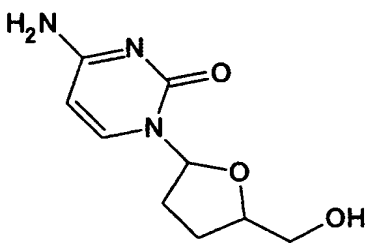
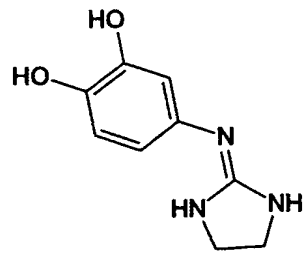
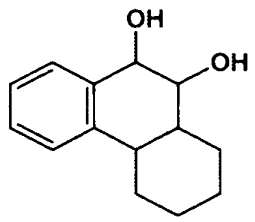
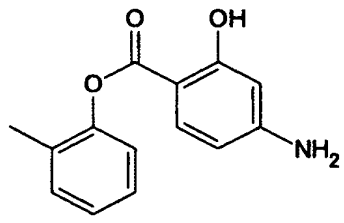
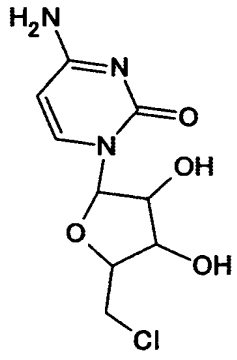
	ZALCITABINE	62	0	183
	234DIHYDROXYPH ENYLIMINOIMIDAZ OLIDINE	60	0	156
	23BENZOCTAHY DRONAPHTHALEN E34DIOH34DIAX	60	0	156
	4AMINOSALICYLI CACID2TOLYLEST ER	60	0	156
	5CHLOROCYTIDIN E	60	63	118

表 2 8

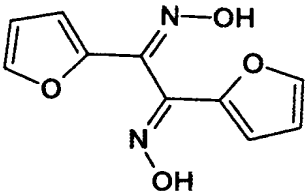
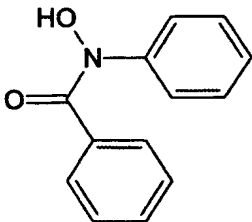
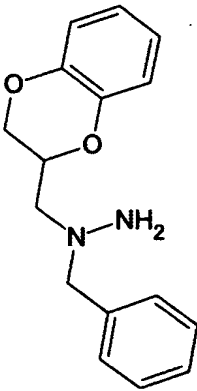
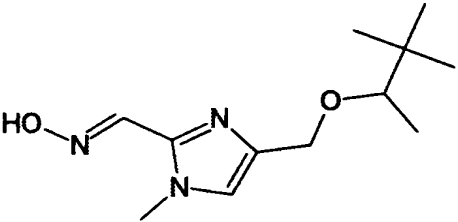
	AFURILDIOXIME	60	0	156
	BENZOYLPHENYL HYDROXYLAMINE	60	0	156
	DOMOXIN	60	0	257
	IMIDAZOLE1METH YL2HYDROXYIMIN OMETHYL412DIME THYLPROPOXYME THYL	60	0	257

表 2 9

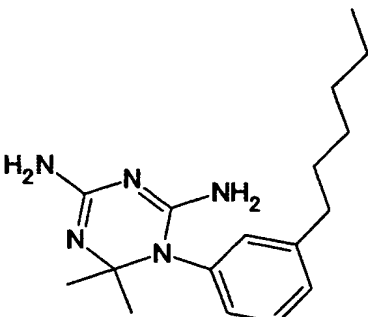
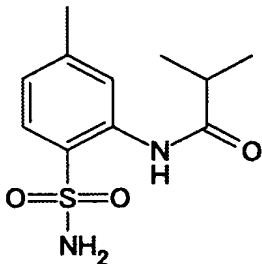
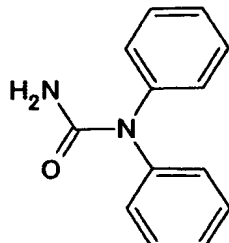
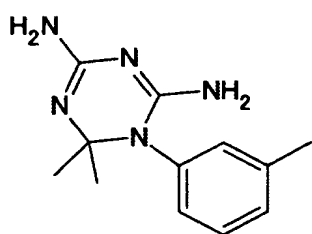
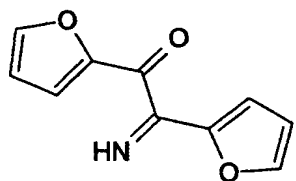
	46DIAM12HSYMTRIAZINE1MHEXYLPHENYL	59	0	281
	BENZENESULFONAMIDE2IBUTYROYLAMINO4METHYL	58	0	204
	11DIPHENYLUREA	57	0	153
	12DIHYDROTRIAZINE22DIMETHYL46DIAMINO13METHYLPHENYL	57	0	153
	AFURILMONOXIME	57	0	153

表 3 0

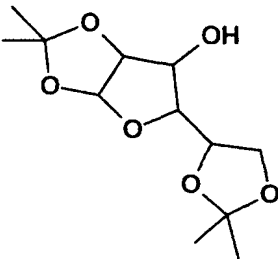
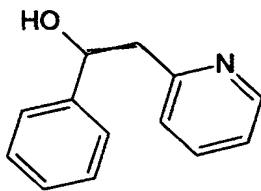
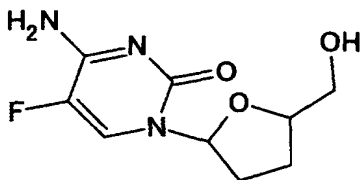
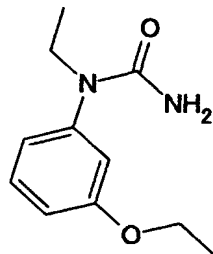
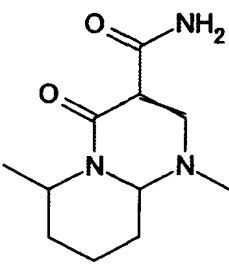
	DIACETONEGLUC OSE	57	0	153
	PYRIDINE2PHENA CYLENOL	57	0	153
	DIDEOXYCYTIDIN E5FLUORO	56	0	177
	UREA1ETHYL1ME THOXYPHENYL	55	0	201
	PYRIDO12APYRIMI DIN4ONE3CONH2 H716DIMEAX	54	0	150



表 3 1

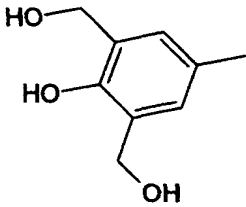
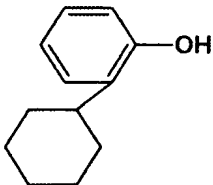
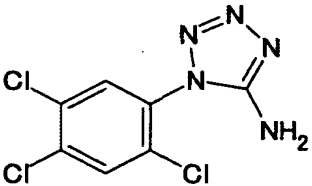
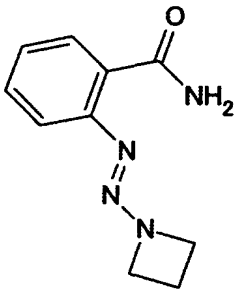
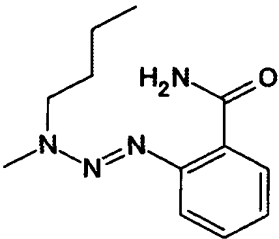
	PHENOL26DIMETH YLOL4METHYL	53	66	133
	2CYCLOHEXYLPH ENOL	52	0	148
	5AMINO1245TRIC HLOPHENYLTE TRAZOLE	52	0	148
	BENZAMIDE23AZE TIDINYLTRIAZENE	52	0	148
	BENZAMIDE23MET HYL3BUTYLTRIAZ ENYL	52	0	224

表 3 2

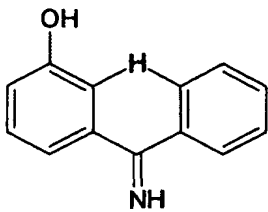
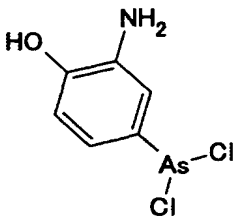
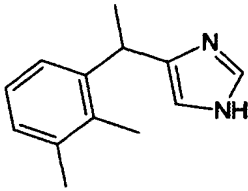
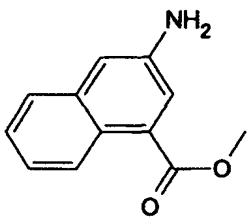
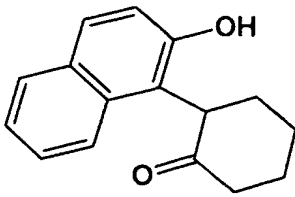
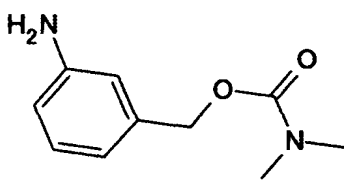
	BENZENEMETHAN IMINEA3HYDROXY PHENYL	52	0	148
	DICHLOROPHENA RSINE	52	0	148
	MEDETOMIDINE	52	0	198
	NAPHTHALENE2A MINO4METHOXYC ARBONYL	52	0	148
	NAPHTHONONE	52	0	148
	NNDIMETHYLCAR BAMATEMAMINO BENZYLESTER	52	0	198

表 3 3

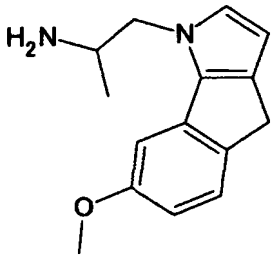
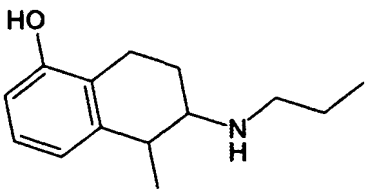
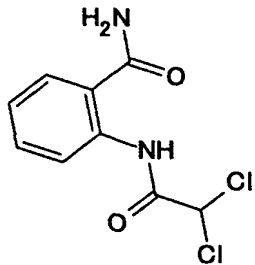
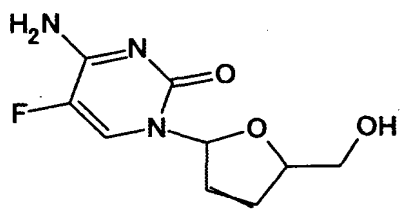
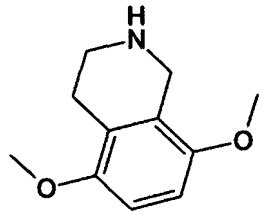
	RO600213	52	0	198
	5HYDROXY1METH YL2AMINOTETRAL INNPROPYL	50	0	222
	BENZAMIDEODICH LOROACETYLAMI NO	50	0	171
	RA131423	50	0	171
	1234H4ISOQUINO LINE58DIMETHOX Y	49	0	145

表 3 4

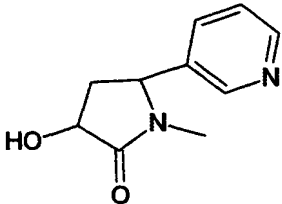
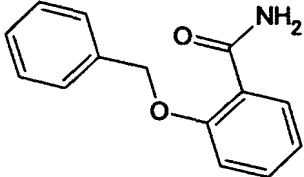
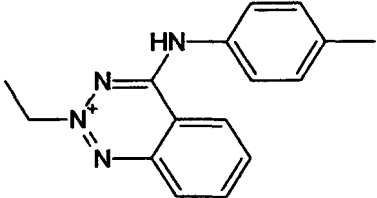
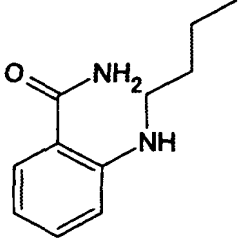
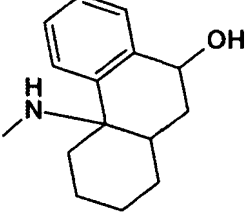
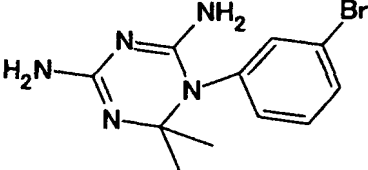
	3HYDROXYCOTININE	49	0	145
	O BENZYLOXYBENZAMIDE	49	0	195
	2ETHYL4PTOLYLAMINO123BENZOTRIAZINIUMIODIDE	47	0	168
	BENZAMIDEOBUTYLAMINO	47	0	219
	OCTAHYDROPHENANTHREN4AAMINEMETHYL9HYDROXY	47	0	168
	13BROMOPHENYL22DIMETHYL46DIAMINOTRIAZINE	46	0	142

表 3 5

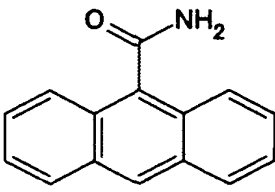
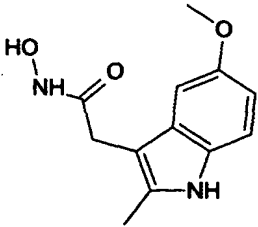
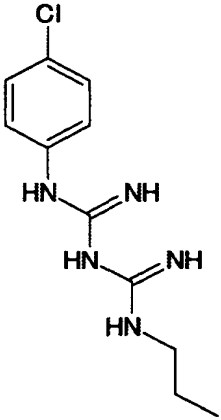
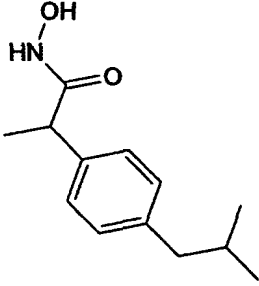
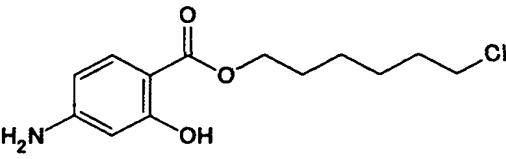
	9ANTHRACENECARBOXAMIDE	46	0	142
	DEBOXAMET	46	0	192
	N1-(4-CHLOROPHENYL)-N5-PROPYLBIGUANIDE	46	0	192
	24-(4-BUTYLPHENYL)-2-HYDROXYPROPIONIC ACID	45	0	242
	6-CHLORO-2-HYDROXY-3-(AMINOXY)BENZOIC ACID HEXYLESTER	45	0	293

表 3 6

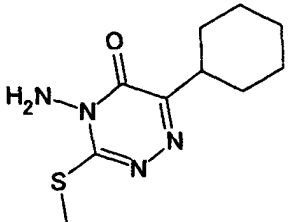
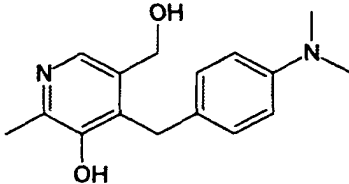
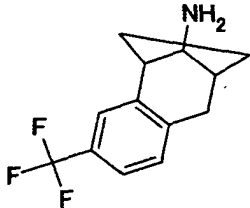
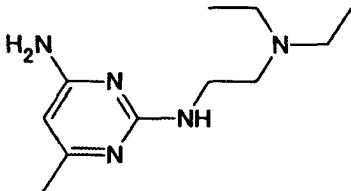
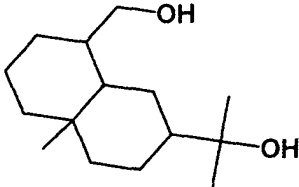
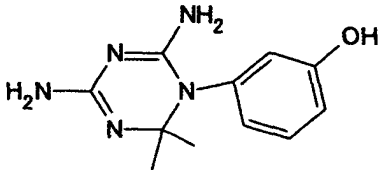
	3METHIO4AMINO6 CYCLOHEXYL124 TRIAZINE5ONE	44	0	165
	4PDIMETHYLANILI NOMETHYLPYRID OXOL	44	0	216
	BENZOCYCLOHEP TANE58METHENO 10AMINO3TRIFLU OROMETHYL	44	0	165
	PYRIMIDINE4AMIN O2DIETHYLAMINO ETHYLAMINO6ME THYL	44	0	266
	TERPENE319717	44	45	145
	12DIHYDROTRIAZI NE22DIMETHYL46 DIAMINO13HYDRO XYPHENYL	43	0	139

表 3 7

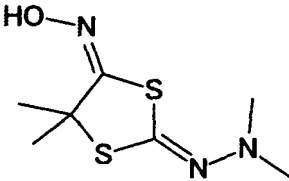
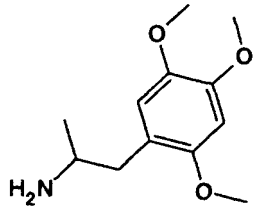
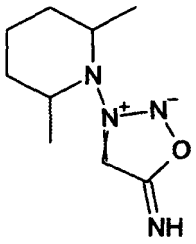
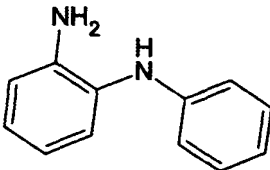
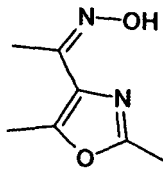
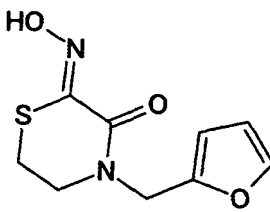
	13DITHIOLANE4O XIMINO2DIMETHY LHYDRAZINO55DI METHYL	43	0	139
	245TRIMETHOXYA MPHETAMINE	43	0	189
	DARSIDOMINE	43	0	139
	OAMINODIPHENYL AMINE	43	0	139
	OXAZOLE4ACETO XIME25DIMETHYL	43	0	139
	PERHYDROTHIAZI N3ONE2OXIMINON 2FURANYLMETHY L	43	0	189

表 3 8

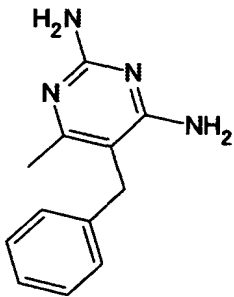
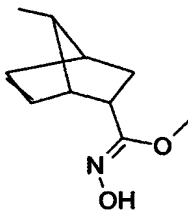
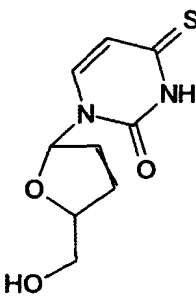
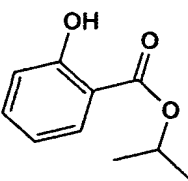
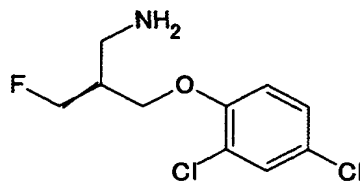
	PYRIMIDINE24DIA MINO5BENZYL6M ETHYL	43	0	189
	5NORBORNEN2YL HYDROXIMICACID METHYLESTER	41	0	162
	DIDEOXYTHIOURI DINE23DEHYDRO	41	0	162
	ISOPROPYLSALIC YLATE	41	0	162
	MDL72145	41	0	213



表 3 9

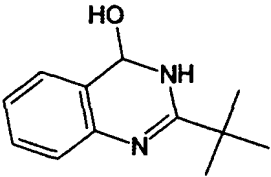
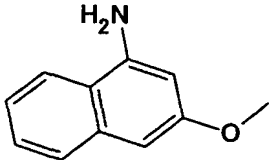
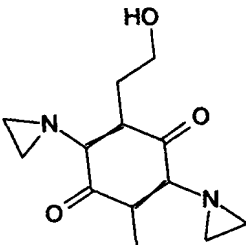
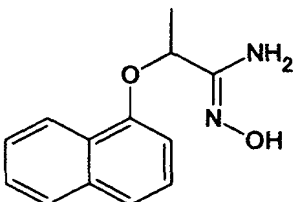
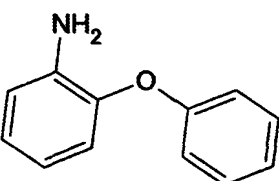
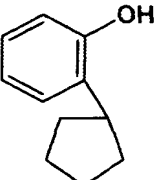
	QUINAZOLINE2TB UTYL34DIHYDRO4 HYDROXY	41	0	162
	1NAPHTHALENEA MINE3METHOXY	40	0	136
	BENZOQUINONE2 5BISAZIRIDINYL3 METHYL6HYDROX YETHYL	40	0	186
	NAPRODOXIME	40	0	186
	OPHENOXYANILIN E	40	0	136
	PHENOL2CYCLOP ENTYL	40	0	136

表 4 0

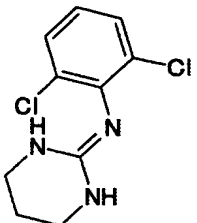
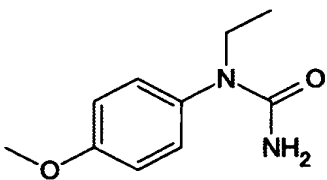
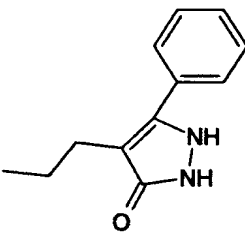
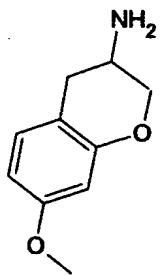
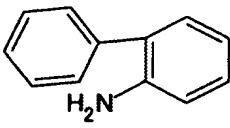
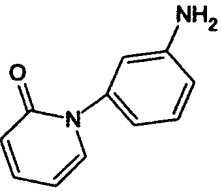
	ST404	40	0	136
	UREA1ETHYL1PANISYL	38	0	159
	12DIHYDROPYRAZOLONE4PROPYL5PHENYL	37	0	183
	24DIMETHOXYAMPHETAMINE	37	0	183
	2AMINOBIIPHENYL	37	0	133
	AMPHENIDONE	37	0	133

表 4 1

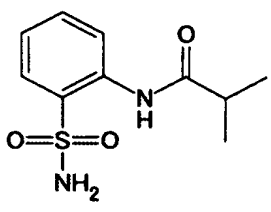
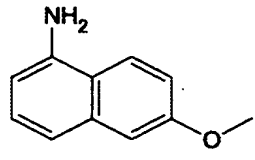
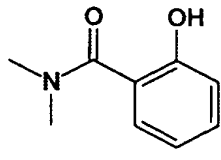
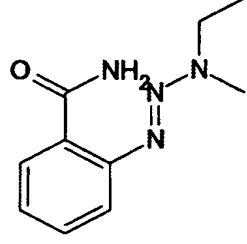
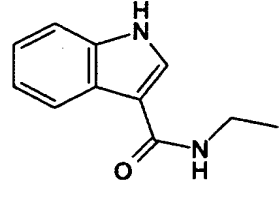
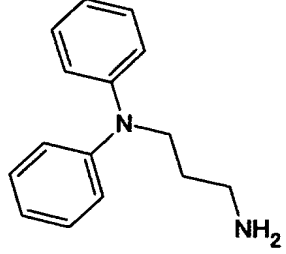
	<p>BENZENESULFON AMIDE2IBUTYRO LAMINO</p>	<p>37</p>	<p>0</p>	<p>183</p>
	<p>NAPHTHALENE1A MINO6METHOXY</p>	<p>37</p>	<p>0</p>	<p>133</p>
	<p>SALICYLAMIDENN DIMETHYL</p>	<p>37</p>	<p>0</p>	<p>133</p>
	<p>BENZAMIDE23MET HYL3ETHYLTRIAZ ENYL</p>	<p>35</p>	<p>0</p>	<p>156</p>
	<p>INDOLE3NETHYLC ARBOXAMIDO</p>	<p>35</p>	<p>0</p>	<p>156</p>
	<p>NNDIPHENYLPRO PYLENEDIAMINE</p>	<p>35</p>	<p>0</p>	<p>207</p>

表 4 2

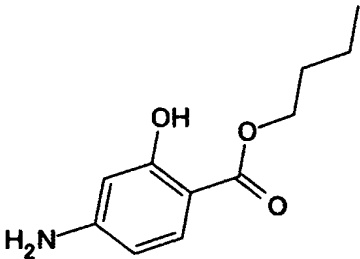
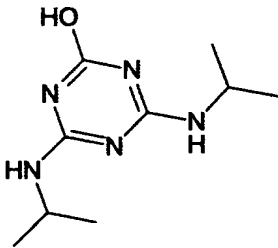
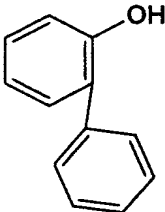
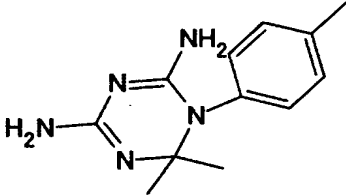
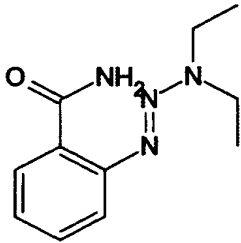
 <chem>CCCCOC(=O)c1cc(N)ccc1O</chem>	PAMINOSALICYLI CACIDNBUTYLES TER	35	0	207
 <chem>CC(C)Nc1nc(NC(C)C)c(O)n1</chem>	2OH46BISIPROPY LAMINOSTRIAZIN E	34	0	180
 <chem>c1ccccc1-c2ccccc2O</chem>	2PHENYLPHENOL	34	0	130
 <chem>Cc1ccc(N2C(=N1)N(C)C(=N2)N)cc1</chem>	46DIAM22DIME14 METHYLPHSTRIA ZINE	34	0	130
 <chem>CCN(CC)Nc1nc2ccccc2c(=O)[nH]1</chem>	BENZAMIDE233DI ETHYLTRIAZENYL	34	0	180

表 4 3

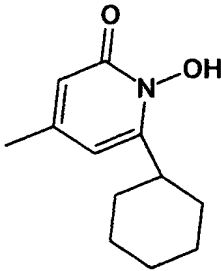
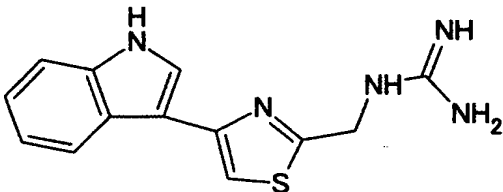
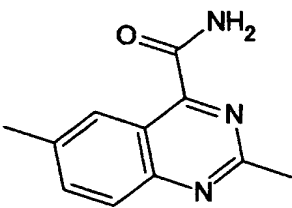
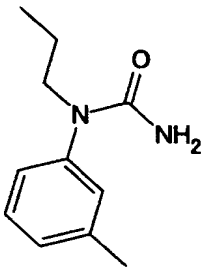
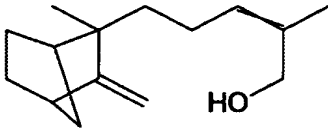
	CICLOPIROX	34	0	130
	INDOLE-3-(2-THIAZOLYL)-L-GLYCYL-L-TYROSINE ETHYL ESTER	34	0	180
	QUINAZOLIN-4(3H)-ONE	34	0	130
	UREA-1-PROPYL-1-METHYL-4-PHENYL-1H-1,2,4-TRIAZOLE	34	0	180
	SANTALOL	33	0	230

表 4 4

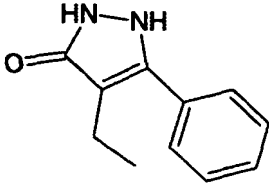
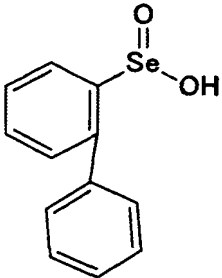
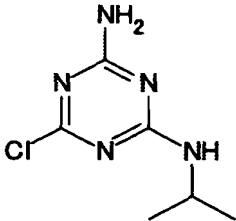
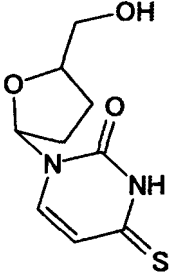
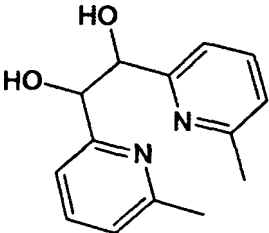
	<p>12DIHYDROPYRAZ OLONE4ETHYL5P HENYL</p>	32	0	153
	<p>2BIPHENYLYLSEL ENIOUSACID</p>	32	0	153
	<p>DESETHYLATRAZI NE</p>	32	0	153
	<p>DIDEOXYTHIOURI DINE</p>	32	0	153
	<p>ETHYLENEGLYCO L12BIS6METHYLP YRID2YL</p>	32	0	204

表 4 5

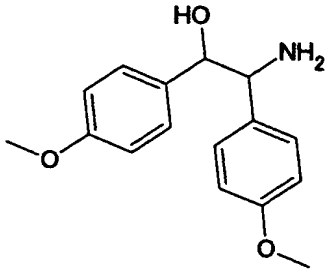
 <chem>COc1ccc(cc1)C(O)(N)c2ccc(OC)cc2</chem>	32	0	204
--	----	---	-----

表 4 6

構造名	MW	LUDL スコア	HB_ ス コア	LPO_ スコア	Rule of 5 Violations	Rotlbonds
13HYDROXYPHENYL3METHOXY3METHYLUREA	196.2054	32	0	153	0	5
1HYDROXPENTACHLOROCYCLOHEXANE	272.3857	28	0	124	0	1
1OHYDROXYMEPHENYL33DIMETRIAZENE	179.2212	18	0	139	0	4
226DIHYDROXYPHENYLIMINOIMIDAZOLINE	193.2048	16	0	112	0	3
24DIAMINO52BR45DIMEOBENZYLPIRIMIDINE	339.1911	19	0	165	0	4
24DIAMINOPYRIMIDINE52CL35DIMEOBENZYL	294.7401	22	0	168	0	4
26DIMETHYLNAPHTHOL	172.2262	19	0	115	0	1
2ENDOAMINO BENZOBI CYCLO222OC TENE	173.2572	25	0	121	0	0
2HPYRAZOLO344QUINOLIZINE1236710BHEXAHYDRO	177.2486	16	0	112	0	0
2METHOXY4MEAMINO6IPROPYLAMINOSTRIAZINE	197.2394	18	0	139	0	4
2METHYL5IPROPYLPHENOL	150.22	15	0	136	0	2
2OH4ETAMINO6DIETAMINOSTRIAZINE	211.2662	23	0	195	0	6
2OH4IPROPYLAMINO6DIETAMINOSTRIAZINE	225.293	20	0	192	0	6
2PROPYL4PTOLYLAMINO123BENZOTRIAZINIUMIOIDE	279.3639	22	0	168	0	4
2PTERIDINAMINE5678TE1RAHYDRO4HYDROXY67DIMETHY	195.2236	16	0	112	0	1
35DIMETHOXYPHENOL	154.1652	16	0	112	0	3
35DITBUTYLPHENOL	206.3272	16	0	162	0	3
3AMINO BENZOICACIDETHYLESTER	165.1914	21	0	142	0	3
3CYCLOHEXENOL1ISOPROPYL4METHYL	154.2516	18	0	139	0	2
3HYDROXY4METHOXYCINNAMICACIDETHYLESTER	222.2402	18	0	139	0	6
3OPENTYLMORPHINE	355.476	16	0	213	0	6
4HYDROXYETHYLVANILLIN	196.2024	31	0	177	0	6
4QUINOLINAMINE2METHYL	158.2024	22	0	118	0	0
4QUINOLINAMINE6ETHOXY24PHENYLBUTADIENYL	316.4018	15	0	136	0	5
5METHOXY8QUINOLINOL	175.1866	28	0	124	0	2
6METHYL5INDANOL	148.2042	16	0	112	0	1
8QUINOLINAMINE6METHOXY	174.2018	25	0	121	0	1
AAMIDOETHYLCINNAMATE	219.2396	27	0	148	0	5
AAMIDOMETHYLCINNAMATE	205.2128	28	0	124	0	4
ANILINE35DIMETHOXY	153.1804	22	0	118	0	2
ANILINE35DITBUTYL	205.3424	19	0	165	0	2
ANTHRALIN102HYDROXYETHIO	302.3442	17	0	189	0	6



表 4 7

ATROMEPINE	303.4004	22	0	219	0	6
BENZAMIDENHEXYL34DIHYDROXY	237.298	29	0	251	0	9
BENZAMIDEOISOPROPYLAMINO	178.2334	15	0	136	0	3
BENZENEMETHANIMINE25DIMETHYLAPHENYL	209.2902	16	0	112	0	2
BENZENESULFONAMIDE22ETHYLBUTANOYLAMINO	270.3458	22	0	219	0	6
BENZOICACID2AMINOMETHYLESTER	151.1646	19	0	115	0	2
BENZOICACIDHYDRAZIDE033DIMETRIAZINO	207.2346	40	0	136	0	4
BENZON	212.2476	16	0	162	0	4
BENZOINOXIME	227.2622	28	0	174	0	5
BENZYLALCOHOL35DIMETHOXY4HYDROXY	184.1914	21	0	142	0	5
CARVEOL	152.2358	18	0	139	0	2
CINAMETICACID	238.2396	16	0	162	0	8
CYPENAMINE	161.2462	25	0	121	0	1
CYTIDINE23DIDEHYDRO23DIDEOXY	209.2042	15	0	136	0	3
CYTIDINEDIDEOXY3FLUORO	229.2105	18	0	139	0	3
CYTOSINE2BUTOXY	167.2102	17	0	189	0	4
DMDC	239.2304	27	0	148	0	4
EGGONINEMETHYLESTER	199.2492	27	0	148	0	3
ETHYCHLOZATE	238.6731	20	0	192	0	4
ETHYLENEGLYCOLMONO24DICHLOROPHENYLETHER	207.056	25	0	171	0	4
ETHYLMETHYLGLOXIME	130.1462	27	83	65	0	4
F11105	203.2432	15	0	136	0	2
FLOVERINE	198.2182	22	0	168	0	6
GUANIDINE1METHYL14CHLOROPHENYL	183.6401	19	0	115	0	2
GUANIDINEN43AMINOPHENYLTHIAZOL2YL	233.2904	22	0	118	1	2
HEXAHYDROFLUOREN9AAMINE	187.284	28	0	124	0	0
ILEPRO	228.2906	16	83	130	0	6
IMIDAZOLINE22HYDROXYPHENYL	162.1908	19	0	115	0	2
INDOLE3CARBOXYLICACIDETHYLESTER	189.2134	18	0	139	0	3
INDOLE3IMIDAZOL1YLMETHYL	197.239	16	0	162	0	2
INDOLE3NMETHYLCARBOXAMIDO	174.2018	28	0	124	0	2
LAMIVUDINE	229.2532	18	0	139	0	3
METHYLBENZOATE2AMINO5CHLORO	185.6097	16	0	112	0	2
METHYLSALICYLATE	152.1494	16	0	112	0	3

表 4 8

MORPHINE3HEXANOYL	383.4864	25	0	222	0	7
MPENTOXYPHENOL	180.2462	16	0	213	0	6
N1PCHLOROPHENYLN5METHYLBIGUANIDE	225.6803	43	0	139	0	5
N2N4N6TRIMETHYLN3NNHYDROXYMETHYLMELAMINE	258.2796	17	3	186	0	9
NAPHTHALENE1AMINO3CHLORO	177.6329	25	0	121	0	0
NAPHTHALENE1AMINO3METHYL	157.2146	25	0	121	0	0
NAPHTHALENE1AMINO6CHLORO	177.6329	28	0	124	0	0
NBUTYLSALICYLIDENEIMINE	177.2456	20	0	192	0	5
NCYCLOPENTYLCINNAMAMIDE	215.2944	27	0	148	0	4
NETHYLMORPHINE	299.3688	136	0	257	0	3
NHYDROXYETHYLPTP	203.2834	31	0	177	0	4
NITRAFUDAM	231.2104	25	0	121	0	2
NNDIMETHYLTRYPTAMINE6METHOXY	218.298	29	0	201	0	4
OMETHOXYBENZAMIDE	151.1646	16	0	112	0	2
OMETHYLCINNAMAMIDE	161.203	22	0	118	0	2
OMETHYLTYROSEETHYLESTER	223.2712	30	0	227	0	6
PAMINOSALICYLICACID4CHLOROBUTYLESTER	243.6895	22	0	219	0	7
PAMINOSALICYLICACIDNAMYLESTER	223.2712	25	0	222	0	7
PENTA24DIENYLAMINE23455PENTACHLORO	255.3583	18	0	139	0	2
PENTALAMIDE	207.2718	19	0	216	0	6
PHENOL2HEPTYL	192.3004	21	0	142	0	7
PHENYLBORONICACIDMETHOXYACETAMIDO	209.0081	19	0	165	0	7
PICOLINHYDROXAMICACID	166.1792	19	0	115	0	3
PROTOCATECHUICACIDETHYLESTER	182.1756	15	0	136	0	5
PYRAZINE2AMIDINO56DIMETHYL3METHYLAMINO	179.2242	25	0	121	0	2
PYRAZOLE23DIHYDRO3IMINO15DIMETHYL2PHENYL	187.2438	25	0	121	0	1
PYRAZOLE24DIMETHYL5PHENYL	172.2292	16	0	112	0	1
PYRAZOLE426DIMETHYLPHENYLMETHYL	186.256	16	0	162	0	2
PYRAZOLE4METHYL5PHENYL	158.2024	16	0	112	0	1
PYRIDINE22HYDROXYPHENYL	171.1982	25	0	121	0	2
PYRIDINE4HYDROXY26BISMETHOXYCARBONYL	211.1738	22	0	118	0	5
PYRIMIDINE24DIAMIO6METHYL5PHENYL	200.2426	22	0	118	0	1
PYRIMIDINE2AMINO4DIETHYLAMINOETHYLAMINO56DIMET HYL	237.3472	26	0	248	0	6

表 4 9

PYRIMIDINE2DIMETHYLAMINO4METHYLAMINO	152.1986	19	0	115	0	0	2
PYRIMIDINE2HYDRAZINO4METHOXY6METHYL	154.1712	19	0	115	0	0	2
PYRIMIDINE4AMINO2DIMETHYLAMINO	138.1718	28	0	124	0	0	1
QUINOLINE4AMINO7CHLORO	178.6207	22	0	118	0	0	0
RA161045	371.484	19	0	216	0	0	5
SYMTRIAZINE2ETHYLAMINO4TBUTYLAMINO6HYDROXY	211.2662	22	0	168	0	0	5
TERPENE319712	268.3954	25	0	171	0	0	4
TETRAHYDROPYRAN24DIONE31ETHOXYIMINOBTUTYL66SPI	323.4314	23	0	195	0	0	6
RO35DIMETHYLCYCLOHEXYL	227.7111	16	0	112	0	0	1
TIMIRDINE	335.8229	27	0	148	0	0	3
TIZOLEMIDE	206.287	17	0	189	0	0	5
UREA1BUTYL1PTOLYL	178.2334	29	0	150	0	0	3
UREA1ETHYL1MTOLYL	194.2328	29	0	150	0	0	4
UREA1ETHYL1OANISYL	208.2596	31	0	177	0	0	5
UREA1ETHYL1OETHOXYPHENYL	164.2066	22	0	118	0	0	2
UREA1METHYL1MTOLYL	152.2358	19	0	115	0	0	1
VERBENOL	272.3	22	0	118	0	0	4
VESTITOL							

EXAMPLE 6

LBD 欠失変異体 (deletion mutant) による活性低下

Mammalian Two Hybrid レポーター系において、TR3、TINUR の LBD 領域を完全に欠失させた遺伝子を導入したところ、prostaglandin A2 による転写活性は抑制された (図 8)。したがって、prostaglandin A2 は実際にこれらの核内受容体の LBD 領域に作用して働いていることが示唆された。

EXAMPLE 7

ビアコアによる PGA 誘導体の TR3 および TINUR への結合の証明

Mammalian Two Hybrid レポーター系において明らかになった、TR3 および TINUR に対する PGA 誘導体のリガンド結合活性を完全に証明するために、TR3 および TINUR の GST-LBD をそれぞれ大腸菌で発現させ精製した。ビアコア S 5 1 を用い、GST との比較対照のもと、TR3 および TINUR の LBD に PGA1、PGA2 が結合している様子を捉えることができた (図 9)。レポーターで活性のなかったネガティブコントロール化合物の 13, 14-dihydro-15-keto-PGA2 では LBD に結合しなかった。

EXAMPLE 8

アトピー性皮膚炎病態の末梢血好酸球で、TR3 や TINUR のようなアポトーティックな性格の遺伝子が亢進しているのは、病態に伴って末梢血で増加する好酸球を減少させなければならないというネガティブなフィードバック制御が働くためと考えられる。そこで、どのような刺激でこの遺伝子が好酸球から発現されるかを *in vitro* で調べた。

健康人から末梢血好酸球を大量に採取し、シャーレでの活性化を抑えて浮遊培養させ、IL-5 や IL-4 などのサイトカイン刺激で活性化させたが、TR3 の誘導はみられなかった。それに対し、好酸球に特異的な細胞内経路でアポトーシスを誘導させ、喘息などの治療薬として可能性があることから最近注目されている好酸球 CD30 に対するアゴニスト活性をもった抗 CD30 抗体で、細胞をアポトーシス刺激すると、1-3 時間の処理の間に培養末梢血好酸球中で TR3 や TINUR が劇的に誘導されることが明らかになった (表 5 0、図 1 0、図 1 1)。以下の表 5 0 は、ヒト末梢血好酸球のアポトーシス誘導についてまとめたものである。

表 5 0

		Annexin V 陽性細胞 (%)
新鮮		4.0
対照		2.30

抗-CD30 抗体	1 時間	9.20
抗-Fas 抗体		5.20
対照	3 時間	4.50
抗-CD30 抗体		20.00
抗-Fas 抗体		13.80
対照	24 時間	11.70
抗-CD30 抗体		63.00
抗-Fas 抗体		31.20

抗 Fas 抗体では、抗 CD30 抗体より反応が遅いながらアポトーシスが起こるにも関わらず TR3 および TINUR の誘導がかからなかったので、これまでとは違った好酸球特異的アポトーシス経路の可能性はある。これらの現象（アポトーシス誘導及び T R 3 や T I N U R の発現誘導）は、好酸球特異的細胞株である AML14. 3D10 を抗 CD30 抗体で処理したときも同様に観察された（図 1 2、1 3、1 4）。

この好酸球を特異的に細胞死に導く経路を、TR3 や TINUR の機能の増強を通じて促進することは、喘息のみでなく、本発明者らの調べたアトピー性皮膚炎も含めた種々のアレルギー疾患の治療に繋がる可能性が高い。本発明者らの意図する治療戦略の一例を図 1 5 に示す。